

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



TESIS DOCTORAL

**Determinación del valor pronóstico de las mutaciones en la
región de unión a ADN del gen p53 en pacientes con cáncer
colorrectal esporádico**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Sara Rafael Fernández

DIRECTORES:

María Luisa, dir Maestro de Las Casas
Marta, dir Vidaurreta Lázaro

Madrid, 2015



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE



5327663671

T616.348-006.04

RAF
det

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR I



**DETERMINACIÓN DEL VALOR PRONÓSTICO DE
LAS MUTACIONES EN LA REGIÓN DE UNIÓN A
ADN DEL GEN *p53* EN PACIENTES CON CÁNCER
COLORRECTAL ESPORÁDICO.**

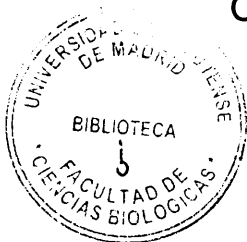
TESIS DOCTORAL

Sara Rafael Fernández

Directora: Maria Luisa Maestro de las Casas

Codirectora: Marta Vidaurreta Lázaro

Madrid, 2011



1 40990734

6 27630158

A mi abuelo Jesús



AGRADECIMIENTOS

Ha sido duro el camino para la elaboración de la tesis pero, por fin, se ha alcanzado el objetivo. Sin embargo, este proceso no habría sido posible sin el apoyo, la orientación y la colaboración de muchas personas a las que quiero mostrar brevemente mi agradecimiento.

Quiero destacar la dirección de la Dra. Marisa Maestro, al brindarme la oportunidad de profundizar en uno de los temas que siempre me atrajeron en la investigación y reconociéndole su motivación, su apoyo y su lucha, esenciales para que este proyecto haya llegado a buen puerto.

También quiero agradecerle a mi codirectora, la Dra. Marta Vidaurreta, su orientación, paciencia, consejos y, en definitiva, su gran colaboración.

A mi compañera de siempre, Silvia Veganzones, y a las que llegaron después, Beatriz Mediero y Virginia de la Orden, por su apoyo y su ayuda, especialmente en los momentos de crisis científica.

También ha sido muy valiosa la colaboración de la Dra. Cristina Fernández, aportándome su paciencia y su ayuda en la comprensión del difícil lenguaje de la estadística.

Al Dr. Javier Cerdán quiero agradecerle su labor como profesional, además de la confianza que depositó en mí casi sin conocerme, al ponerme en contacto y hacer posible que me integrara en el equipo del que ahora formo parte.

También me gustaría agradecer la ayuda de otras personas que comparten conmigo la vida fuera del trabajo.

Mis padres han ocupado un papel importante. Ellos me han apoyado en la realización de la carrera de biología, en mi orientación a la genética y en el

difícil camino de la investigación. En el caso de mi madre, se ha añadido su papel de crítica en la redacción de la tesis, venciendo su rechazo instintivo inicial por tener predisposición familiar a dicha enfermedad. También a toda mi familia por su cariño y su confianza.

Quiero dar las gracias a mis amigos y amigas. En el caso de las biólogas, por su disposición a hablar de la tesis y de las complicaciones con las técnicas, y al resto, por aguantar estas conversaciones. A todos por su cariño y su comprensión y, especialmente a Eduardo, por su paciencia infinita, su gran apoyo, su aporte de equilibrio y sobre todo por su cariño.

Por último, quiero recordar el esfuerzo que realizan todas las personas e instituciones que en mayor o menor medida posibilitan la investigación y luchan contra los obstáculos que surgen en este camino.

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE CONTENIDOS	
Capítulo 1: INTRODUCCIÓN	1
I. EPIDEMIOLOGÍA	1
A. Cáncer	1
B. Cáncer colorrectal (CCR)	3
II. ANATOMÍA	6
III. ETIOPATOGENIA	8
A. Formas de presentación del CCR	8
B. Factores de riesgo	10
IV. HISTOLOGÍA	25
A. Clasificación histopatológica	27
V. SECUENCIA ADENOMA-CARCINOMA	34
VI. VÍAS GENÉTICAS DE LA CARCINOGENESIS COLORRECTAL	36
A. Vía de la inestabilidad cromosómica	38
B. Vía de la inestabilidad de microsatélites	39
C. Carcinogénesis colorrectal asociada a <i>MYH</i>	42
VII. BASES GENÉTICAS DE LA CARCINOGENESIS COLORRECTAL	44
A. Genes supresores de tumores	44
B. Protooncogenes	48
C. MMR	50
VIII. Gen p53	54

A. Estructura	55
B. Regulación	57
C. Funciones	58
D. p53 y cáncer	61
IX. FACTORES PRONÓSTICO EN CÁNCER COLORRECTAL	64
A. Estadio tumoral	64
B. Otros factores implicados en el pronóstico	68
C. Nuevos factores asociados a pronóstico	72
Capítulo 2: OBJETIVOS	75
Capítulo 3: PACIENTES Y MÉTODO	77
I. PACIENTES	77
I.A. Periodo de estudio	77
I.B. Población de estudio	77
II. MÉTODO	79
II.A. Metodología Clínica	79
II.B. Metodología Analítica	80
II.C. Metodología Estadística	87
Capítulo 4: RESULTADOS	91
I. DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN	91
I.A. Variables clinicopatológicas	91
I.B. Inestabilidad de microsatélites	94
II. ESTUDIO DE LAS MUTACIONES DEL GEN <i>p53</i>	95
III. ESTUDIO DE LA RELACIÓN DE LAS MUTACIONES DEL GEN <i>p53</i> CON LAS VARIABLES CLINICOPATOLÓGICAS Y LOS FACTORES PRONÓSTICO.	99

III.A. Relación de las mutaciones del gen <i>p53</i> con las variables clinicopatológicas y los factores pronóstico.	99
III.B. Relación de las mutaciones en los codones y en los exones del gen <i>p53</i> incluidos en el estudio con las variables clinicopatológicas y los factores pronóstico.	102
IV. ESTUDIO DE LA RELACIÓN DE LAS MUTACIONES EN EL GEN <i>p53</i> CON LA INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES.	106
IV.A. Relación de las mutaciones del gen <i>p53</i> con el estado de la MSI.	106
IV.B. Relación de las mutaciones del gen <i>p53</i> con el estado de la MSI. Análisis por exones.	107
IV.C. Relación de las alteraciones detectadas en los codones del gen <i>p53</i> mutados con mayor frecuencia con el estado de la MSI.	109
V. EVOLUCIÓN POSTOPERATORIA DE LOS PACIENTES CON CARCINOMA COLORRECTAL ESPORÁDICO. ANÁLISIS DE LA INFLUENCIA PRONÓSTICA: SUPERVIVENCIA GLOBAL	113
V.A Estudio de la supervivencia global	113
V.B Análisis univariable de la probabilidad acumulada de fallecer de los pacientes con CCR, en relación con las variables clínico-patológicas y con los factores pronóstico.	114
V.C Análisis univariable de la probabilidad acumulada de fallecer de los pacientes con CCR, en relación con la presencia de mutaciones en <i>p53</i> .	120
V.D Análisis estratificado de la supervivencia global en función de las mutaciones de <i>p53</i> .	123
V.E Análisis multivariable de la supervivencia global	127

VI. EVOLUCIÓN POSTOPERATORIA DE LOS PACIENTES CON CARCINOMA COLORRECTAL ESPORÁDICO. ANÁLISIS DE LA INFLUENCIA PRONÓSTICA: SUPERVIVENCIA LIBRE DE ENFERMEDAD	129
VI.A Estudio de la supervivencia libre de enfermedad	129
VI.B Análisis univariable de la probabilidad acumulada de recidivar de los pacientes con CCR, en relación con las variables clinicopatológicas y con los factores pronóstico.	130
VI.C Análisis univariable de la probabilidad acumulada de recidivar de los pacientes con CCR, en relación con la presencia de mutaciones en <i>p53</i> .	134
VI.D Análisis estratificado de la supervivencia libre de enfermedad en función de las mutaciones de <i>p53</i> .	136
VI.E Análisis multivariable de la supervivencia libre de enfermedad	138
Capítulo 5: DISCUSIÓN	141
Capítulo 6: CONCLUSIONES	159
BIBLIOGRAFÍA	161
ABREVIATURAS	191
ANEXO I: Tablas del análisis detallado de la relación de las mutaciones de <i>p53</i> con las variables clinicopatológicas.	I-A
ANEXO II: Tablas del análisis detallado de la relación de las mutaciones de <i>p53</i> con la supervivencia global.	II-A
ANEXO III: Tablas del análisis detallado de la relación de las mutaciones de <i>p53</i> con la supervivencia libre de enfermedad.	III-A
ANEXO IV: Consentimiento informado.	IV-A

ÍNDICE DE FIGURAS

Capítulo 1: INTRODUCCIÓN

Figura 1. Incidencia del cáncer en varones en los países desarrollados.	2
Figura 2. Incidencia del cáncer en mujeres en los países desarrollados.	2
Figura 3. Mortalidad por cáncer en España en varones.	4
Figura 4. Mortalidad por cáncer en España en mujeres.	5
Figura 5. Representación esquemática intestino grueso.	6
Figura 6. Distribución de las formas de presentación de cáncer colorrectal.	10
Figura 7. Esquema histológico del colon.	25
Figura 8. Secuencia adenoma-carcinoma.	34
Figura 9. Secuencia de alteraciones genéticas detectadas durante la tumorigénesis colorrectal.	37
Figura 10. Secuencia de alteraciones genéticas detectadas durante la tumorigénesis colorrectal asociadas a la secuencia adenoma-carcinoma.	39
Figura 11. Mecanismos de acción de la proteína APC.	46
Figura 12. Mecanismos de acción de DCC. A: Acción como receptor de dependencia en las criptas intestinales en función de la concentración de netrina-1. B: Activación de apoptosis.	47
Figura 13. Ruta de transducción de señales de EGF con K-RAS implicado.	50

Figura 14. Mecanismo de acción del sistema enzimático de reparación de errores.	52
Figura 15. Esquema de la estructura del gen p53.	56
Figura 16. Unión de p53 a la doble hélice de ADN.	62
Figura 17. Efecto de la alteración de p53.	63
Figura 18. Relación de las clasificaciones de Dukes y TNM.	68
Capítulo 2: MATERIAL Y METODOS	
Figura 19. Esquema de detección de mutaciones por SSCP.	83
Figura 20. Ejemplo gel SSCP: exón 7.	86
Figura 21: Ejemplo de secuenciación. Codón 248 exón 7, mutación en heterocigosis de sustitución de una Citosina por una Timina.	87
Capítulo 3: RESULTADOS	
Figura 22. Distribución de tumores colorrectales de acuerdo con las variables clinicopatológicas.	93
Figura 23. Distribución de tumores colorrectales de acuerdo con la MSI.	94
Figura 24. Distribución de los pacientes en función de la presencia y el número de mutaciones en p53.	95
Figura 25. Distribución de los tipos de alteraciones detectadas.	96
Figura 26. A: Frecuencia de mutación de p53 en cada uno de los exones analizados. B: distribución de las mutaciones detectadas en p53 en función de los exones.	98
Figura 27. Distribución en porcentajes del estado de mutación del codón 175 de p53 en función de la localización. Serie de pacientes diagnosticados de CCR en el Hospital Clínico San Carlos de Madrid (Marzo 1995-Abril 2003).	103

Figura 28. Distribución en porcentajes del estado de mutación del codón 288 de p53 en función de la localización. Serie de pacientes diagnosticados de CCR en el Hospital Clínico San Carlos de Madrid (Marzo 1995-Abril 2003).	104
Figura 29. Curva de supervivencia global acumulada de los pacientes con CCR. Serie de pacientes diagnosticados de CCR en el Hospital Clínico San Carlos de Madrid (Marzo 1995-Abril 2003).	114
Figura 30. Curva de supervivencia global acumulada de los pacientes con cáncer colorrectal según el estadio de Dukes. Serie de pacientes diagnosticados de CCR en el Hospital Clínico San Carlos de Madrid (Marzo 1995-Abril 2003).	116
Figura 31. Curva de supervivencia global acumulada de los pacientes con cáncer colorrectal según el grado de diferenciación tumoral. Serie de pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal en el Hospital Clínico San Carlos de Madrid (Marzo 1995-Abril 2003).	117
Figura 32. Curva de supervivencia global acumulada de los pacientes con cáncer colorrectal según el estado de MSI. Serie de pacientes diagnosticados de CCR en el Hospital Clínico San Carlos de Madrid (Marzo 1995-Abril 2003).	118
Figura 33. Curva de supervivencia global acumulada de los pacientes con cáncer colorrectal en función de las mutaciones del codón 175 de p53. Serie de pacientes diagnosticados de CCR en el Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo 1995-Abril 2003).	121
Figura 34. Curva de supervivencia libre de enfermedad acumulada de los pacientes con CCR. Serie de pacientes diagnosticados de CCR en el Hospital Clínico San Carlos de Madrid (Marzo 1995-Abril 2003).	130

Figura 35. Curva de supervivencia libre de enfermedad acumulada de los pacientes con CCR según el estadio de Dukes. Serie de pacientes diagnosticados de CCR en el Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo 1995-Abril 2003).

132

ÍNDICE DE TABLAS**Capítulo 1: INTRODUCCIÓN**

Tabla I. Síndromes hereditarios con incremento del riesgo de CCR.	11
Tabla II. Clasificación de pólipos colorrectales.	27
Tabla III. Clasificación histológica de tumores colorrectales según la OMS.	32
Tabla IV. Oligonucleótidos repetidos de las secuencias MSI del consenso.	41
Tabla V. Clasificación de Dukes.	65
Tabla VI. Definiciones para la Clasificación TNM.	66
Tabla VII. Relación de la clasificación TNM con la de Dukes y su relación con el pronóstico.	67
Tabla VIII. Descripción de los grados de diferenciación.	70

Capítulo 2: MATERIAL Y METODOS

Tabla IX. Resumen de los cebadores específicos empleados en la PCR.	84
--	----

Capítulo 3: RESULTADOS

Tabla X. Relación de la mutación del gen <i>p53</i> con las variables clinicopatológicas y los factores pronóstico. Serie de pacientes diagnosticados de CCR en el Hospital Clínico San Carlos de Madrid (Marzo 1995-Abril 2003).	100
--	-----

Tabla XI. Resumen de los resultados significativos del análisis detallado de la relación de la mutación del gen <i>p53</i> con las variables clinicopatológicas y los factores pronóstico. Serie de pacientes diagnosticados de CCR en el Hospital Clínico San Carlos de Madrid (Marzo 1995-Abril 2003).	105
Tabla XII. Resumen de los resultados del análisis de la relación de la mutación del gen <i>p53</i> con el estado de la MSI. Serie de pacientes diagnosticados de CCR en el Hospital Clínico San Carlos de Madrid (Marzo 1995-Abril 2003).	107
Tabla XIII. Resumen de los resultados del análisis por exones de la relación de la mutación del gen <i>p53</i> con el estado de la MSI. Serie de pacientes diagnosticados de CCR en el Hospital Clínico San Carlos de Madrid (Marzo 1995-Abril 2003).	109
Tabla XIV. Resumen de los resultados del análisis por codones de la relación de la mutación del gen <i>p53</i> con el estado de la MSI. Serie de pacientes diagnosticados de CCR en el Hospital Clínico San Carlos de Madrid (Marzo 1995-Abril 2003).	112
Tabla XV. Análisis univariable de la supervivencia global en relación con las variables clinicopatológicas y los factores pronóstico en la serie de pacientes con CCR diagnosticados en el Hospital Clínico San Carlos de Madrid (Marzo 1995-Abril 2003).	119
Tabla XVI. Análisis univariable de la supervivencia global en relación con las mutaciones del gen <i>p53</i> . Serie de pacientes con CCR diagnosticados en el Hospital Clínico San Carlos de Madrid (Marzo 1995-Abril 2003).	122
Tabla XVII. Resumen del análisis estratificado de la supervivencia global en función de las mutaciones del gen <i>p53</i> . Variables en las que se obtuvo un nivel de significación inferior a 0,1. Serie de pacientes diagnosticados de CCR en el Hospital Clínico San Carlos (Marzo 1995-Abril 2003).	124

Tabla XVIII. Análisis univariable de la supervivencia libre de enfermedad en relación con las variables clinicopatológicas y los factores pronóstico en los pacientes con CCR con cirugía curativa. Hospital Clínico San Carlos de Madrid (Marzo 1995-Abril 2003). 133

Tabla XIX. Análisis univariable de la supervivencia libre de enfermedad en relación con las mutaciones del gen *p53*. Serie de pacientes con CCR diagnosticados en el Hospital Clínico San Carlos de Madrid (Marzo 1995-Abril 2003). 135

Tabla XX. Resumen del análisis estratificado de la supervivencia libre de enfermedad en función de las mutaciones del gen *p53*. Variables en las que se obtuvo un nivel de significación inferior a 0,1. Serie de pacientes diagnosticados de CCR en el Hospital Clínico San Carlos. (Marzo 1995-Abril 2003). 136

Capítulo 1: INTRODUCCIÓN

I. EPIDEMIOLOGÍA

En la actualidad, el cáncer representa la segunda causa de muerte en los países desarrollados, por detrás de las enfermedades cardiovasculares, y la tercera en los países en vías de desarrollo. De acuerdo con los datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer es responsable del 12,6% de las muertes mundiales¹.

I.A. Cáncer

Según la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer de la OMS (IARC), en el año 2008 se diagnosticaron 12,7 millones de nuevos casos de cáncer en el mundo, 6.038.545 en mujeres y 6.639.430 en hombres, provocando la muerte de 7,6 millones de personas². En los países desarrollados, el cáncer más frecuente en hombres es el de próstata, seguido del de pulmón, el colorrectal y el de vejiga (Figura 1). En mujeres, el cáncer de mama es el más frecuente, seguido del cáncer colorrectal, el de pulmón y el de útero (Figura 2)².

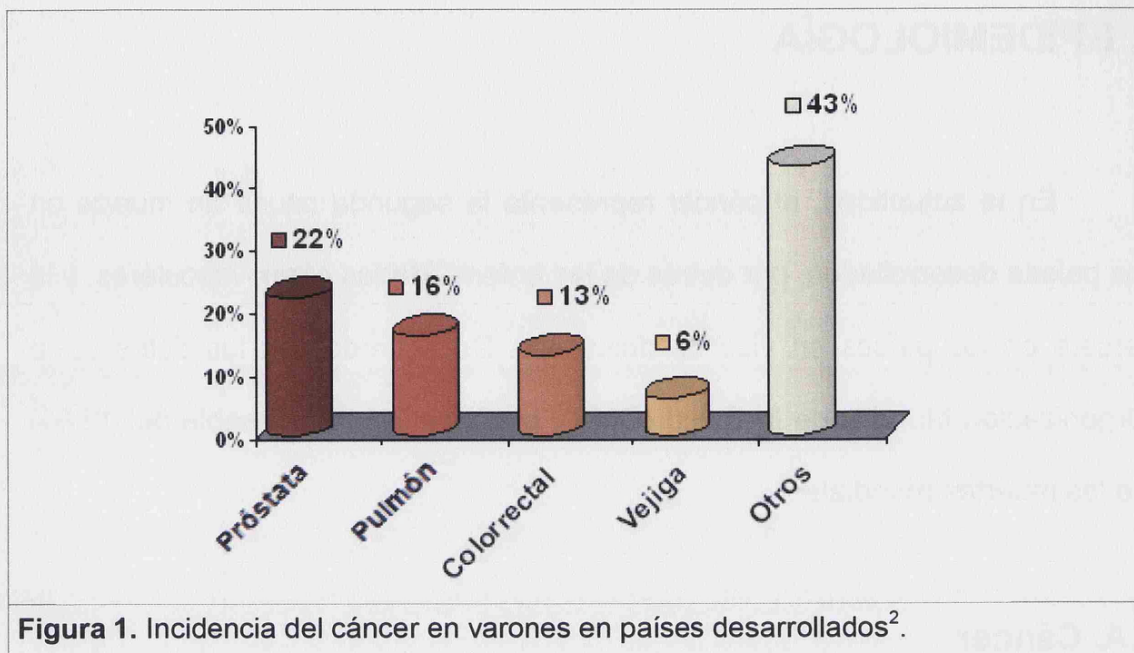


Figura 1. Incidencia del cáncer en varones en países desarrollados².

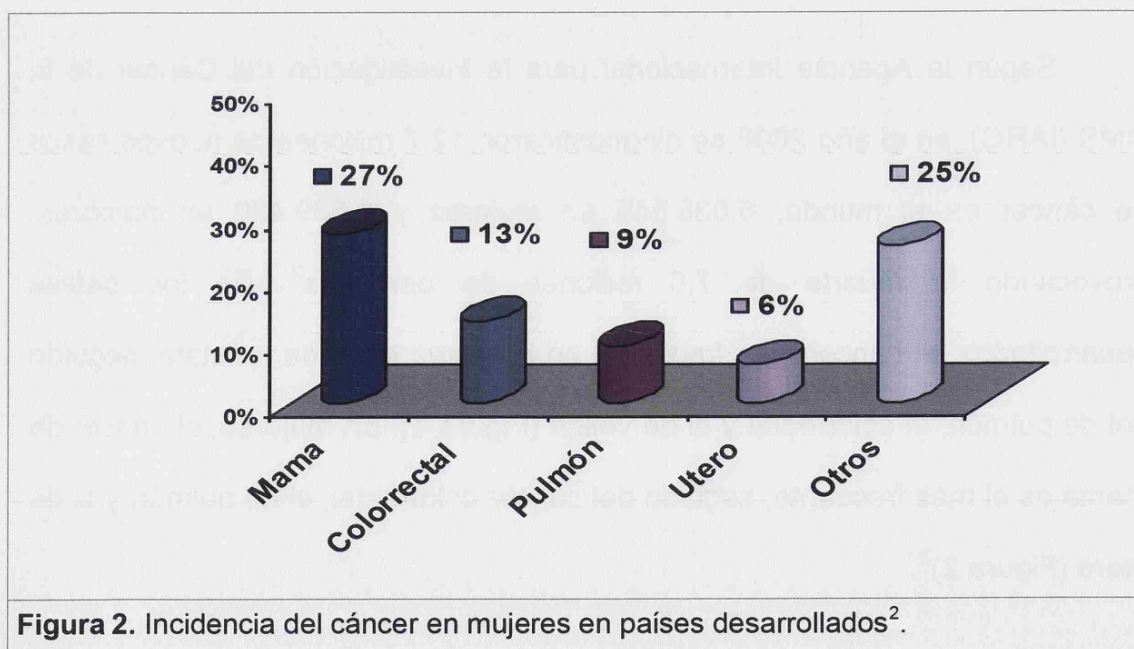


Figura 2. Incidencia del cáncer en mujeres en países desarrollados².

En España, durante el año 2005, el cáncer constituyó la primera causa de muerte en hombres y la segunda en mujeres, después de las enfermedades cardiovasculares, provocando el 30,3% y el 19,4% de los fallecimientos,

respectivamente³. En cuanto a la localización anatómica de los tumores, en hombres el cáncer de pulmón es el más frecuente, seguido del colorrectal, el de próstata y el de vejiga, mientras que los tumores de mama son los más frecuentes en mujeres, seguidos del cáncer colorrectal, de útero y de ovario⁴. Durante las últimas décadas, el número de nuevos casos ha aumentado, pero las tasas de mortalidad globales han ido disminuyendo gracias a los avances registrados en el diagnóstico y el tratamiento. Sin embargo, aún no se ha conseguido evitar que el número absoluto de muertes anuales por cáncer siga incrementándose lentamente³.

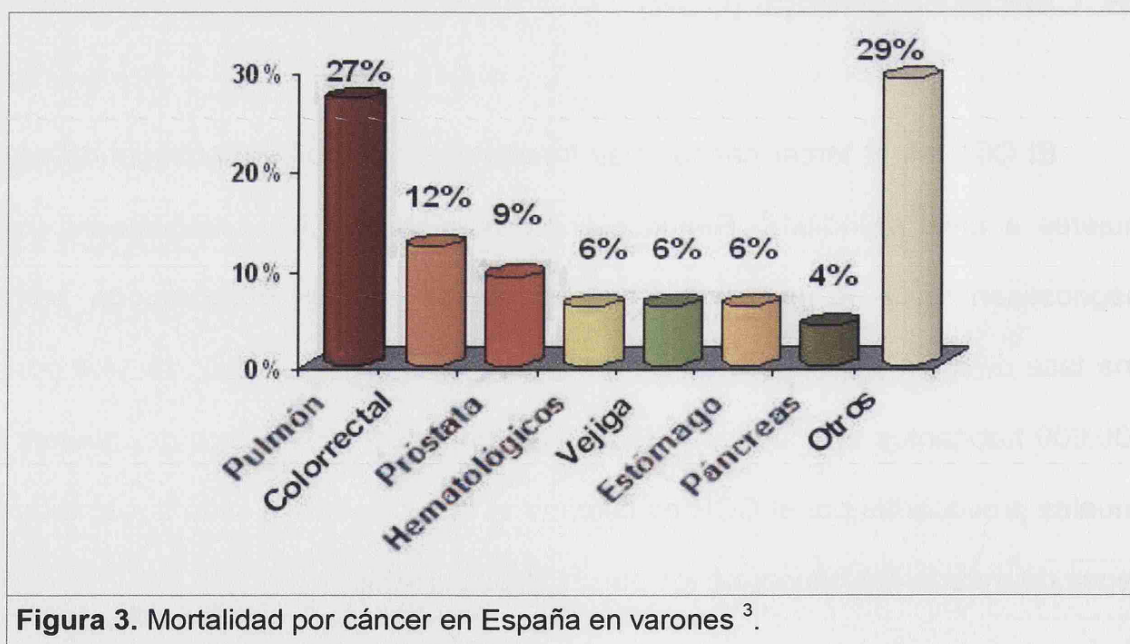
I.B. Cáncer colorrectal (CCR)

El CCR es el tercer cáncer más frecuente en hombres y el segundo en mujeres a nivel mundial^{2,5}. Según estimaciones de la OMS, anualmente se diagnostican cerca de un millón de nuevos casos de CCR en el mundo, con una tasa de incidencia, ajustada por edad a la población mundial, de 14,4 por 100.000 habitantes en mujeres y de 19,1 en hombres². El número de muertes anuales provocadas por el CCR es cercano al medio millón, siendo la segunda causa de muerte por cáncer en los países desarrollados³.

La incidencia del CCR, según datos de la OMS-IARC, es mayor en los países desarrollados que en aquellos que están en vías de desarrollo². El riesgo de padecer CCR en los países desarrollados se ha estimado en un 4,6% en hombres y un 3,2% en mujeres⁵.

Según los datos del Centro Nacional de Estadística (CNE), en el año 2003 la estimación anual de nuevos casos de cáncer en España era cercana a 22.000, con una relación hombre:mujer de 3:2. La edad media de presentación de la mayoría de los casos de cáncer de colon y recto es alrededor de los 65 años de edad⁴.

En España, el CCR es la segunda causa de muerte por cáncer en ambos sexos, superada por el cáncer de pulmón en hombres y el cáncer de mama en mujeres (Figura 3 y 4)².



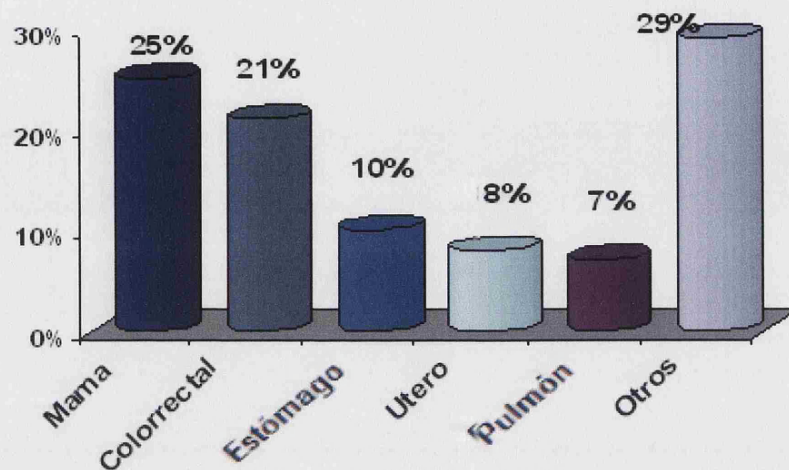


Figura 4. Mortalidad por cáncer en España en mujeres ³.

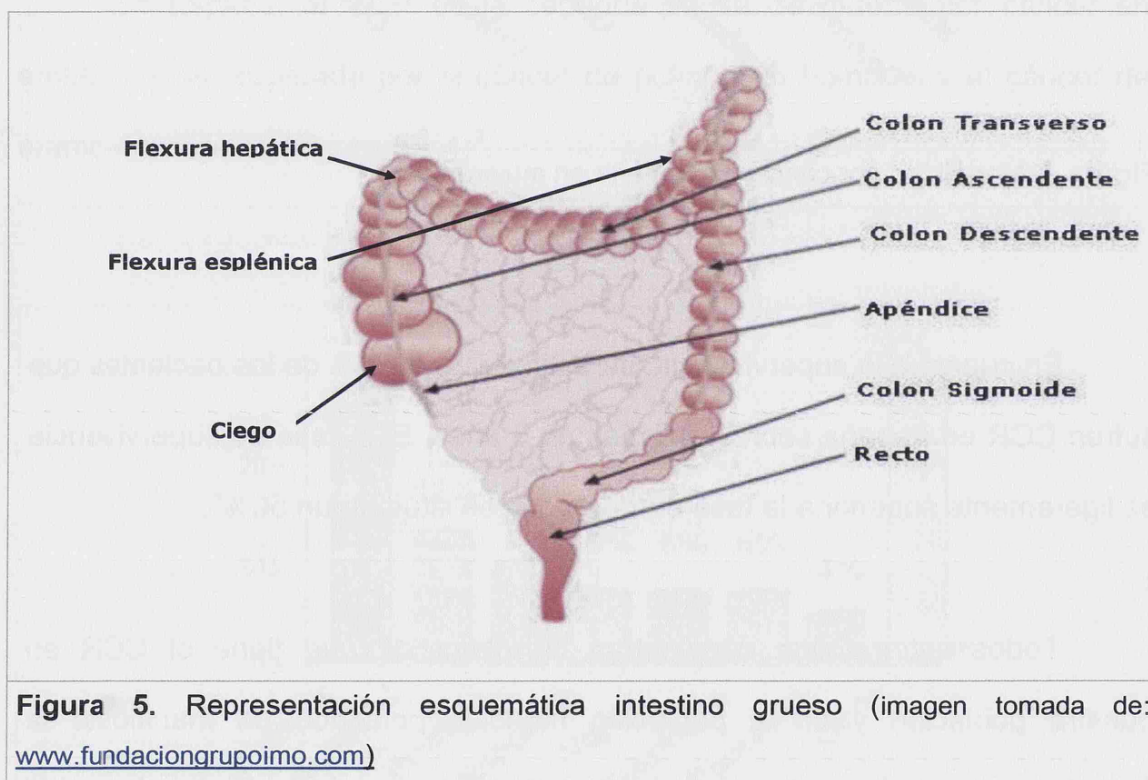
En cuanto a la supervivencia, se estima que el 54% de los pacientes que sufren CCR en España sobrevivirá más de 5 años. Esta tasa de supervivencia es ligeramente superior a la tasa europea que se sitúa en un 50%⁶.

Todos estos datos demuestran la irrelevancia que tiene el CCR en nuestra población y en la población mundial, poniendo de manifiesto la importancia de mejorar el conocimiento de todos los procesos implicados en el desarrollo de esta enfermedad.

Por todo ello, sería de gran interés prevenir este tipo tumores, diagnosticarlos en estadio precoz y disminuir su morbilidad. A su vez, un mejor conocimiento del comportamiento biológico de la enfermedad es necesario para poder predecir y controlar su evolución.

II. ANATOMÍA

Los tumores colorrectales incluyen todos los localizados en el intestino grueso y en este trabajo se evaluarán como una sola entidad. Anatómicamente el intestino grueso comprende colon y recto (Figura 5).



Los tumores localizados en recto han sido tratados por otros autores como entidad independiente. Si bien el cáncer de recto presenta un comportamiento epidemiológico diferente al de colon, el origen embriológico del recto y la región adyacente del colon es común y los cánceres que en ellos se desarrollan comparten muchas características⁵.

En el colon existen dos regiones con origen embrionario diferenciado: colon proximal y colon distal. Según la región donde se localicen los tumores, se han descrito diferencias en: edad del diagnóstico, tipo histológico, respuesta a tratamiento e incluso en el mecanismo molecular de desarrollo del tumor⁷.

En este trabajo se define como colon proximal la región que va desde ciego hasta colon transversal (Figura 5). Se origina a partir del intestino primitivo medio en el embrión y está irrigado por la arteria mesentérica superior⁸.

Se define como distal la región comprendida entre la flexura esplénica y el inicio del recto (Figura 5). Esta región deriva del intestino primitivo posterior y está irrigado por la arteria mesentérica inferior⁸.

III. ETIOPATOGENIA

Debido a la incidencia del CCR y su grave impacto en la población, numerosos esfuerzos se han centrado en la mejora de la información disponible sobre la patogenia, así como respecto a los procesos de carcinogénesis y las alteraciones moleculares asociadas a este tipo de tumores. Se han descrito factores hereditarios y factores ambientales implicados en la aparición del tumor y su desarrollo, siendo importante analizar el papel de cada uno de ellos en el proceso tumoral.

El cáncer se considera una enfermedad provocada por una acumulación de alteraciones moleculares en los genes que intervienen en la regulación del ciclo celular, que provocan el crecimiento descontrolado y la transformación de las células.

III.A. Formas de presentación del CCR

De acuerdo con su forma de presentación, el CCR se pueden clasificar en esporádico, familiar y hereditario.

Más del 70% de los casos son de tipo esporádico, es decir, las alteraciones sólo se producen en el tumor y su aparición está provocada por la influencia de factores ambientales (Figura 6)⁹.

En otro tipo de tumores, la base genética no es conocida pero afectan a varios miembros de una familia presentando un comportamiento muy similar. Existen antecedentes de CCR en dos o más familiares de primer grado hasta en un 25% de las familias con este tipo cáncer (Figura 6). Se considera que en estos casos existe una predisposición genética, bien por la acción conjunta de alteraciones en varios genes, bien por factores epigenéticos, que pueden conferir un riesgo de padecer CCR hasta 2,5 veces superior que en la población general¹⁰. En estos casos, los factores ambientales determinarán quiénes, de entre los individuos predispuestos genéticamente, desarrollarán adenomas pequeños, adenomas grandes o, finalmente, CCR.

El CCR hereditario es la forma de presentación menos frecuente y supone menos del 10% de los casos (Figura 6). Las formas más frecuentes son: el cáncer colorrectal hereditario no polipósico (CCHNP), que representa un 2-3%, la poliposis adenomatosa familiar (PAF), que supone menos de 1%, y la poliposis hamartomatosa, que representa menos del 0,1% de los casos¹¹.

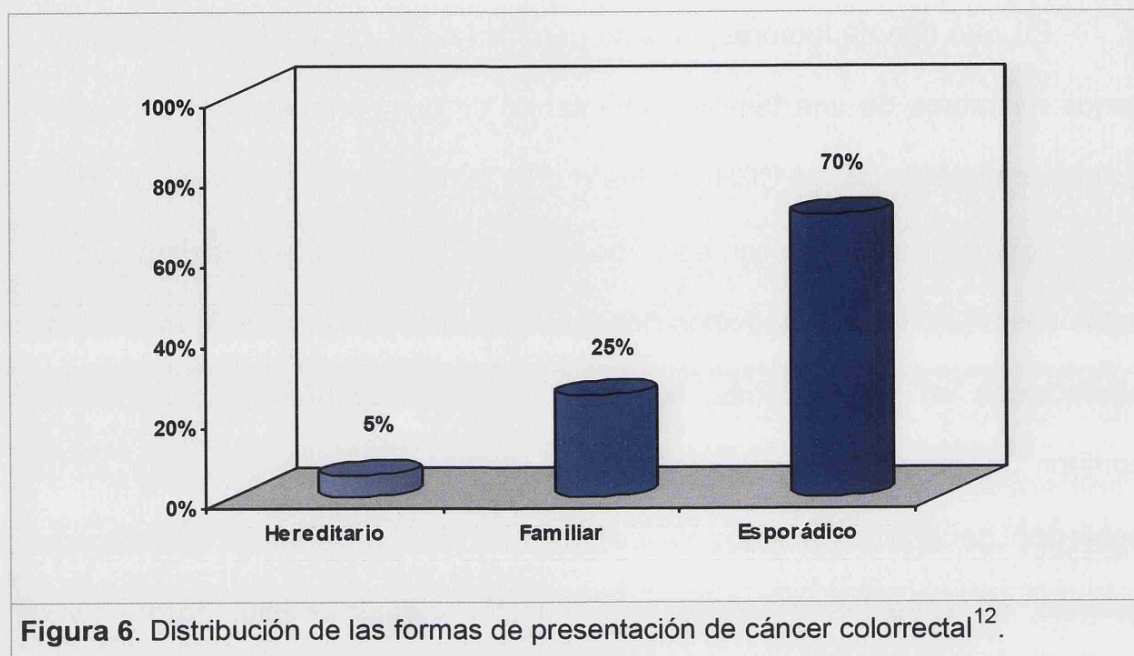


Figura 6. Distribución de las formas de presentación de cáncer colorrectal¹².

III.B. Factores de riesgo

III.B.1 Factores hereditarios de predisposición al CCR

Las formas con componente hereditario se caracterizan por una aparición temprana. El riesgo de desarrollar un tumor está relacionado con el grado de parentesco con los familiares en los que se ha detectado la enfermedad. Estas formas se pueden clasificar en síndromes polipósicos y no polipósicos (Tabla I). Los síndromes hereditarios más frecuentes son la PAF y el CCHNP, si bien se han descrito numerosos síndromes con predisposición genética.

Tabla I. Síndromes hereditarios con incremento del riesgo de CCR

SINDROMES POLIPOSICOS		SINDROMES NO POLIPOSICOS
Poliposis adenomatosas	Poliposis Hamartomatosas	
Poliposis adenomatosa Familiar (PAF)	Poliposis juvenil	Cáncer colorrectal Hereditario no Polipósico (CCHNP)
Síndrome de Turcot	Síndrome de Peutz-Jeghers	
Síndrome de Gardner	Enfermedad de Cowden	

B.1.1 Síndromes polipósicos más frecuentes

Este tipo de síndromes se caracteriza por la aparición de pólipos en un número muy variable. Estas lesiones iniciales pueden malignizarse, dando lugar a la aparición del tumor, y aparecen en alrededor del 1% de todos los casos de CCR¹¹

Los pólipos se pueden clasificar en dos tipos: adenomatosos y hamartomatosos. Los adenomatosos son neoplasias que se deben a la proliferación displásica del epitelio. Son lesiones de crecimiento lento y su riesgo de malignización es proporcional a tres características: tamaño, formación histológica y magnitud de la displasia epitelial¹³.

Los pólipos hamartomatosos están compuestos por células de la mucosa intestinal con una proliferación anómala. Se considera que este tipo presenta menor potencial neoplásico, incluso hay autores que señalan que la

malignización de los hamartomas se debe a la expresión del componente adenomatoso que aparece en algunos de estos pólipos¹⁴.

A continuación se describen los síndromes polipósicos más frecuentes que se han asociado a CCR.

Poliposis adenomatosa familiar (PAF)

Fue el primer síndrome de predisposición genética al CCR clínicamente descrito y tienen una incidencia de 1 en 6000-13.000. Se caracteriza por la presencia de un mínimo de 100 pólipos en colon y recto, si bien el número puede ser mucho más elevado, y pueden tener localización extracólica. Su aparición es temprana, siendo 16 años la edad media de identificación de este tipo de poliposis. Sin tratamiento quirúrgico, la mayoría de los individuos que lo padecen desarrollan un cáncer en la cuarta o quinta década de vida¹⁰.

Este síndrome presenta una herencia autosómica dominante y está asociado a mutaciones en el gen *Adenomatous Polyposis Coli* (APC), en el cromosoma 5q21. Las mutaciones germinales de APC presentan una penetrancia cercana al 100%, aunque la expresión fenotípica de la enfermedad muy variable¹⁵. Existe asociación entre distintas mutaciones germinales y el número de pólipos presentes a lo largo del tracto gastrointestinal¹⁶.

Poliposis juvenil (PJ)

La poliposis juvenil se caracteriza por la presencia de pólipos en el tracto gastrointestinal en número reducido. Un tercio de los casos de PJ son de etiología hereditaria, mientras que el resto son esporádicos. La forma hereditaria de PJ tiene herencia autosómica dominante y presenta una incidencia de 1/100.000 individuos¹¹.

Se caracteriza por la presencia de pólipos hamartomatosos en la región colorrectal a edad temprana, aunque también pueden localizarse en intestino delgado y estómago⁵. Los pacientes con PJ hereditaria, a diferencia de los individuos con formas esporádicas de la enfermedad, continúan desarrollando pólipos a lo largo de toda su vida. Se estima que el riesgo de desarrollar CCR en este grupo de pacientes es de aproximadamente un 38%⁹.

Howe et al. identificaron mutaciones en el gen *SMAD4/DPC4*, un gen supresor de tumores implicado en la regulación de factores de crecimiento, en familias con PJ¹⁷.

Síndrome de Peutz-Jeghers

Síndrome de carácter autosómico dominante en el que se desarrollan hamartomas en el músculo liso del tracto gastrointestinal y aparece pigmentación por melanina en piel y mucosas⁵. Los pólipos hamartomatosos se

localizan desde el esófago hasta el recto. La pigmentación suele presentarse en los labios y la mucosa oral, aunque puede aparecer en otras áreas de la piel. Se considera que afecta a 1 de cada 200.000 personas¹¹.

Aunque la mayoría de los pólipos son benignos y sin características displásicas, el síndrome de Peutz-Jeghers ha sido relacionado con el desarrollo de tumores colorrectales, de páncreas, estómago o de intestino delgado. También se ha asociado a tumores en otras localizaciones como mama, ovario, pulmón, útero y cervix. Se estima que el riesgo de desarrollar CCR en estos pacientes es de un 39%¹⁸.

En las familias afectadas por este síndrome se han descrito mutaciones en el gen *LKB1* ó *STK11*, situado en el cromosoma 19 y que codifica una proteína-quinasa¹⁹.

B.1.2. Síndromes no polipósicos

Cáncer Colorrectal Hereditario No Polipósico (CCHNP)

Aproximadamente del 1 al 6% de los CCR pueden incluirse dentro de los criterios que definen el CCHNP, también conocido como síndrome de Lynch. Es una enfermedad heredada con carácter autosómico dominante. Se han desarrollado criterios para el diagnóstico correcto de este síndrome (criterios de Ámsterdam)^{13, 20,21}.

- Tres o más casos con CCR en un mínimo de dos generaciones.
- Uno de los individuos afectados es familiar de primer grado de consanguinidad del paciente.
- Al menos uno de los afectados es menor de 50 años.
- No cumplir criterios de PAF.

En la mayoría de las familias que cumplen los criterios de CCHNP, se han detectado mutaciones en la línea germinal en los genes reparadores, implicados en la corrección de los errores producidos durante la replicación. Se han asociado a este síndrome alteraciones en diferentes genes: *hMSH2*, *hMLH1*, *hMSH6*, *hPMS1*, *hPMS2*, y *hMLH3*^{2,2}.

III.B.2 Otros factores implicados en el CCR

En la mayoría de los casos, los factores hereditarios por sí solos no pueden explicar la aparición del tumor, es necesaria la actuación de otros factores para desencadenar el proceso de carcinogénesis. Estudios epidemiológicos han demostrado que existen factores que favorecen la aparición de tumores y otros que presentan un efecto protector. Entre los primeros se encuentran agentes capaces de inducir alteraciones genéticas (radiaciones o sustancias químicas) o bien sustancias que actúan directamente favoreciendo la proliferación celular (hormonas o factores de crecimiento).

5327663671

B.2.1 Dieta

En el desarrollo del CCR las alteraciones genéticas se localizan en las células epiteliales de la mucosa del intestino grueso, que están en contacto directo con los alimentos ingeridos. Debido a esto, la dieta tiene un efecto importante en el desarrollo de este tipo de tumores.

Fibra

En 1971 Burkitt observó una menor incidencia de CCR en la población africana rural que consumía una dieta rica en fibras vegetales²³. A partir de ese momento la ingesta de fibra se ha convertido en el factor de la dieta más estudiado en relación con el riesgo de padecer CCR.

Numerosos estudios también han demostrado el efecto protector del consumo de fibra en poblaciones europeas y americanas²³⁻²⁶. Sin embargo, en otros estudios no se ha detectado un efecto de la fibra en el CCR²⁷. Esto se puede deber a la heterogeneidad de las poblaciones analizadas o a las diferencias en el proceso que sufren los distintos tipos de fibra (soluble o insoluble) a su paso por el colon.

La fibra no soluble presenta mayor efecto protector ya que no es asimilable por el sistema digestivo humano, esto produce un aumento del tamaño del bolo fecal y contribuye a una disminución del tiempo de tránsito

intestinal. De este modo, se diluyen sustancias potencialmente carcinógenas y se reduce el tiempo de contacto con las células de la mucosa. Este tipo de fibra también produce un efecto saciante que disminuye el consumo de energía, otro de los factores que pueden estar implicados en el desarrollo de tumores²⁸.

Por otro lado, la fibra soluble sufre un proceso de fermentación en el que produce n-butirato, un ácido graso de cadena corta que ejerce un efecto protector. Este ácido graso está implicado en la inducción de apoptosis, diferenciación celular y podría intervenir en la regulación de la expresión de varios protooncogenes²⁹. La fibra produce una acidificación del medio y la inhibición del proceso de transformación de los ácidos biliares primarios en secundarios, que podrían actuar como potenciales carcinógenos³⁰.

Se han realizado varios ensayos clínicos para evaluar el efecto de la dieta rica en fibra, asociado también a la baja ingesta de grasas, para el control de los adenomas colorrectales. En la mayoría de los estudios los resultados han sido poco alentadores, no se pudo demostrar un efecto positivo de este control en la nutrición³¹⁻³⁴. En parte se debió a la dificultad para mantener la dieta rica en fibra, lo que provocó que en el grupo de elevada ingesta de fibra el abandono del estudio fuera más elevado. Además, el tiempo de seguimiento en estos estudios puede resultar corto para apreciar los verdaderos efectos de la ingesta de fibra. En todos los casos, se utilizaron suplementos alimenticios con los que no se alcanzaban las cantidades de fibra ingeridas por las poblaciones africanas en las que se detectó por primera vez el efecto protector²⁸.

Sin embargo, Mc Keown-Eyssen demostró en 1994, con un estudio randomizado, que existía una asociación negativa entre la dieta rica en fibra y con un consumo moderado de grasas y la aparición de recidivas en adenomas colorrectales³¹.

Grasas

Se considera que el consumo elevado de grasa en la dieta podría tener un papel etiológico en el CCR, por este motivo, algunos autores recomiendan limitar su ingesta como medio de prevención de este tipo de cáncer²⁸.

El efecto perjudicial de las grasas es atribuible a las grasas totales y, principalmente, a las de origen animal, ya que se ha atribuido un posible efecto protector a las grasas del pescado^{35,36}. Al analizar el efecto individual de los ácidos grasos saturados o insaturados o del colesterol, no se ha observado relación directa con el CCR. Es más, se han detectado niveles bajos de colesterol en sangre en pacientes diagnosticados de CCR³⁷.

Se cree que el efecto negativo de las grasas puede deberse al aumento en la liberación de ácidos biliares susceptibles de ser transformados en carcinógenos. En muchos casos es difícil discriminar el efecto individual de los componentes de la dieta y la grasa podría ser simplemente un indicador de la ingesta de carne roja o del consumo de energía²⁸.

Proteínas

El papel de las proteínas en conjunto ha sido ampliamente discutido ya que, en función de su origen, juegan un papel distinto en la carcinogénesis colorrectal. De acuerdo con el consenso publicado por la OMS en 1999, el consumo de elevadas cantidades de carne roja en la dieta supone un factor de predisposición a CCR. Sin embargo, el consumo de pescado, así como de carne blanca (aves) y vegetales se consideran factores protectores frente a este tipo de cáncer³⁸.

Se cree que el efecto carcinogénico de las carnes rojas se basa en los productos resultantes del metabolismo de este tipo proteínas. Los compuestos más estudiados son las aminas heterocíclicas (AHC), que aparecen en la superficie de la carne cuando ha sido expuesta a altas temperaturas y tienen capacidad mutagénica. Deben sufrir un proceso de activación metabólica para actuar como mutágenos y se han descrito polimorfismos en las enzimas asociadas a este procesamiento que afectan al riesgo de sufrir CCR^{39,40}. Algunos autores afirman que las cantidades de AHC resultantes de la ingesta de proteínas no son suficientes para producir efecto mutagénico en animales²⁸.

Otro posible mecanismo de predisposición a cáncer asociado al consumo de proteínas de la carne puede ser el aumento de los ácidos biliares secundarios, que poseen efecto promotor de tumores⁴¹.

De nuevo es difícil individualizar el efecto, ya que dietas ricas en carne se asocian a ingesta elevada de energía y falta de fibra.

B.2.2 Hábitos y estilo de vida

Alcohol

Varios estudios han demostrado una relación entre el consumo habitual de alcohol y el riesgo de CCR³⁸. Sin embargo, otros estudios no han encontrado relación o atribuyen el efecto observado a la falta de disponibilidad de ácido fólico que se asocia al consumo de alcohol³⁵. La disminución del ácido fólico disponible provoca un aumento de la proliferación celular de la mucosa, produciendo la aparición de una hiperregeneración del epitelio que hace que sea mucho más sensible a carcinógenos³⁸.

El alcohol se ha asociado especialmente a CCR con localización distal y a la aparición de Inestabilidad de Microsatélites (MSI)^{38,42}. En muchos casos, el consumo de alcohol va asociado al consumo de tabaco, otro de los factores implicados en el riesgo de cáncer. Además, se ha observado que el efecto conjunto de estos dos factores es un 70% superior al que se obtendría si los efectos se sumaran⁴².

Tabaco

El consumo de tabaco es uno de los factores externos más asociados al desarrollo de distintos tipos de tumores, especialmente al cáncer de pulmón. Su vinculación con el CCR se describe en Estados Unidos a partir de los años 70⁴³.

El tabaco puede duplicar o triplicar las probabilidades de padecer CCR. Se cree que su efecto depende de la dosis, de la duración del tabaquismo y la edad de comienzo, sin que se sepa exactamente con qué velocidad disminuye el riesgo cuando se abandona el hábito⁴⁴.

B.2.3. Fármacos

Antiinflamatorios no esteroideos (AINEs)

En 1995 Giovannuccio et al. publicaron un trabajo que demostraba que aquellas mujeres que habían mantenido un tratamiento con aspirina durante más de 20 años presentaban una disminución del riesgo de CCR⁴⁵. Seis años después, el trabajo de García-Rodríguez confirmó el efecto protector del tratamiento a largo plazo con aspirina en ambos sexos pero además demostró que este efecto también se observaba en los tratamientos de seis meses con AINEs diferentes de la aspirina⁴⁶.

El mecanismo de acción de estos fármacos se basa en la inhibición de la ciclooxigenasa (COX-1 y COX-2). La COX-2 no se expresa en epitelio colónico normal pero se ha encontrado sobreexpresada hasta en el 90% de los cánceres de colon⁴⁷.

Tratamientos hormonales.

Se han publicado estudios que sugieren una asociación inversa entre los tratamientos hormonales y el CCR.

Fernández et al. realizaron un metaanálisis con 8 estudios de caso-control y 4 estudios de cohortes, estimando que el Riesgo Relativo (RR) de desarrollar un CCR en las mujeres tratadas con anticonceptivos orales era de 0,82⁴⁸.

En el caso de las terapias hormonales sustitutivas, los estudios realizados han sido observacionales. En 1999 Grodstein et al. realizaron un metaanálisis con 18 estudios epidemiológicos sobre la terapia hormonal sustitutiva en postmenopáusicas y observaron un 20% de reducción en el riesgo de cáncer de colon y un 19% de reducción en el riesgo de cáncer de recto⁴⁹.

B.2.4. Factores clínicos: enfermedad inflamatoria intestinal.

La enfermedad inflamatoria intestinal es un proceso inflamatorio crónico de carácter sistémico, que se expresa, predominantemente, en el tracto gastrointestinal. Su etiología es desconocida y se han descrito dos tipos de patologías, colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn. Ambas patologías se asocian a predisposición a CCR y serán descritas a continuación.

Colitis ulcerosa

Esta enfermedad es un proceso inflamatorio limitado a colon y sólo afecta a mucosa y submucosa, excepto en los casos más graves. Se extiende generalmente de forma continua en sentido proximal a partir del recto¹³.

Se estima que los pacientes con colitis ulcerosa tienen un incremento del 5-10% en el riesgo de padecer CCR⁵. La predisposición de estos pacientes a desarrollar un cáncer va a depender de la cronicidad y la extensión de la enfermedad y los cambios displásicos identificados. El riesgo de desarrollar CCR se ve incrementado hasta 20 veces a partir de los diez años de la aparición de la enfermedad, pero la incidencia de CCR es muy baja si la localización se limita solo a recto. Sin embargo, los cambios displásicos detectados en las colonoscopias de seguimiento son el factor predictivo de riesgo más importante¹³.

Enfermedad de Crohn

Es un proceso inflamatorio crónico, al igual que la colitis ulcerosa. Sin embargo, la afectación en este caso es parcheada y transmural. Puede afectar a la totalidad del tubo digestivo, desde la boca hasta el ano, aunque las localizaciones preferentes son ileon terminal, colon y ano⁵⁰.

En esta enfermedad, el incremento del riesgo de desarrollar CCR parece estar relacionado con el área afectada. De acuerdo con el estudio llevado a cabo por Ekbohm et al., el riesgo de desarrollar CCR es mayor si la enfermedad se localiza solo en colon (RR= 5,6) que si afecta también a ileon (RR= 3,2) o si solo afecta a ileon terminal⁵¹.

IV. HISTOLOGÍA

La pared del colon está formada por diferentes capas, desde el exterior y hacia la luz del intestino grueso se denominan de la siguiente forma (Figura 7):

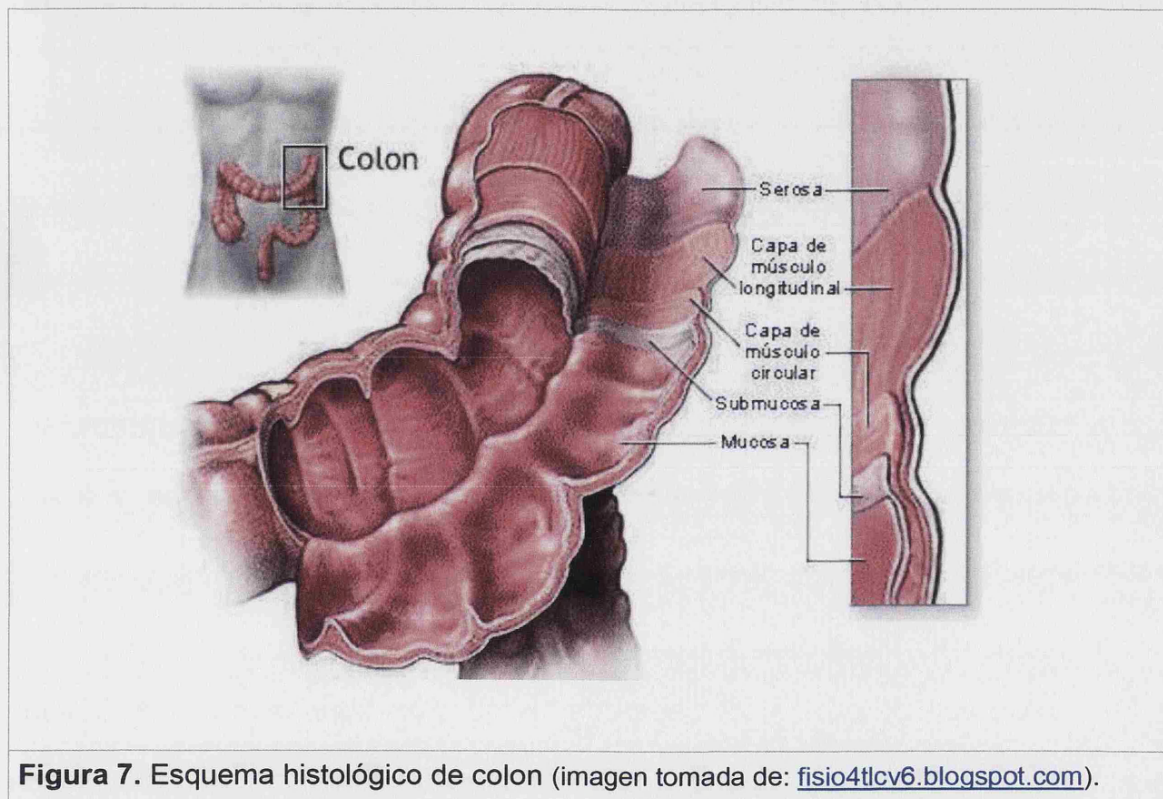


Figura 7. Esquema histológico de colon (imagen tomada de: fisio4tlcv6.blogspot.com).

- Serosa: capa de mesotelio que reviste gran parte del colon, a excepción de su segmento distal y del recto. La parte externa está cubierta por una capa de tejido adiposo que contiene los vasos sanguíneos y los nódulos linfáticos. Se encuentra separada de la capa muscular por una capa de tejido conectivo (subserosa).

- Muscular propia: está formada por dos capas, una interna de fibras lisas dispuesta de forma circular, y una externa con fibras en disposición longitudinal. Entre ambas capas se encuentra el plexo nervioso de Auerbach.

- Submucosa: compuesta por tejido conectivo y fibroblastos. En ella se encuentran los plexos nerviosos de Meiner y los plexos vasculares constituidos por arteriolas, vénulas y vasos linfáticos.

- Muscular de la mucosa: consiste en capa delgada de fibras musculares.

- Lámina Propia: tejido conectivo laxo en el que se encuentran células del sistema inmune, capilares de pequeño calibre, vasos linfáticos y finas estructuras nerviosas.

- Mucosa (epitelio): está separada de la capa anterior por una lámina basal, encargada de dar soporte a las células epiteliales. Su superficie plana está cubierta por glándulas tubulares rectas o criptas, que se extienden hasta la capa muscular de la mucosa. El epitelio cilíndrico simple reviste las criptas y la superficie luminal del colon y es una lámina continua en renovación constante, las células situadas en la mitad inferior de las criptas están en permanente división. Las células indiferenciadas dan origen a células hijas destinadas a diferenciarse y migrar hacia la superficie plana de la mucosa por la pared de la cripta. Estas células se descaman en la superficie luminal después de 6 días.

El proceso de proliferación y renovación de las células de la mucosa en el colon puede sufrir alteraciones, a pesar de estar sometido a muchos mecanismos de regulación. Cuando existe un aumento en la proliferación no asociado a fenómenos de apoptosis, aparece en la superficie del epitelio lo que se denomina pólipo o adenoma⁵².

IV.A. Clasificación histopatológica

Un pólipo es un crecimiento de células de la mucosa, benignas o malignas, que escapa a los mecanismos habituales de regulación y que suelen proliferar hacia la luz del intestino grueso. Los pólipos colorrectales se dividen en dos grupos: no neoplásicos y neoplásicos (Tabla II). Los pólipos epiteliales se originan a partir de las células situadas en la zona basal de las criptas de las glándulas mucosas del colon. La pérdida de los mecanismos de regulación de la proliferación y diferenciación de estas células conduce a la formación de pólipos⁵³.

Tabla II. Clasificación de pólipos colorrectales

Pólipos no neoplásicos	Póliposis Neoplásicos
Pólipo hiperplásico	Adenoma tubular
Pólipo hamartomatoso	Adenoma vellosa
Pólipo inflamatorio	Adenoma tubulovelloso
Pólipo linfoide	Carcinoma polipoide (maligno)

IV.A.1. Pólipos no neoplásicos

A.1.1. Pólipos hiperplásicos

Se considera que suponen hasta el 90% de todos los pólipos; sin embargo, solo alrededor del 20% de los pólipos resecados quirúrgicamente corresponde a este tipo, ya que en su mayoría son asintomáticos. El 60-80% se localizan en recto-sigma y el 20% en colon proximal. Histológicamente, están formados por glándulas y criptas bien formadas, tapizadas por células epiteliales no neoplásicas.

En la mayoría de los casos no presentan potencial maligno, pero una pequeña proporción contienen focos adenomatosos que pueden sufrir transformación maligna⁵³.

A.1.2. Pólipos Hamartomatosos

Estas lesiones están formadas por componentes normales de la mucosa y músculo, distribuidos anormalmente. Presentan malformaciones del desarrollo de las glándulas y de la lámina propia. Pueden observarse esporádicamente o estar asociados a síndromes de poliposis con componente hereditario. Generalmente, son únicos o en número escaso. Cuando se asocian al síndrome de PJ aparecen numerosos pólipos en todo el tubo digestivo. Estas lesiones tienen muy bajo potencial de malignización⁵⁴.

A.1.3. Pólipos inflamatorios

Este tipo de pólipos está compuesto por un centro de tejido conectivo con componente inflamatorio, recubierto por epitelio intestinal regenerativo. Se detectan en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal, más frecuentemente en la colitis ulcerosa. Se originan en la reepitelización de las úlceras y pueden ser únicos o múltiples, con distribución en todo el colon.

No presentan potencial maligno y los carcinomas que se desarrollan sobre una enfermedad inflamatoria intestinal lo hacen en las áreas con cambios displásicos, no en estos pólipos⁵⁴.

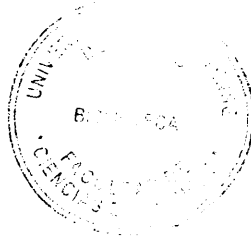
A.1.4. Pólipos linfoides

Este tipo de pólipos son proliferaciones mucosas secundarias a hiperplasias de tejido linfoide mucoso y submucoso. Se localizan en todo el tubo digestivo y no presentan potencial maligno⁵⁴.

IV.A.2. Pólipos neoplásicos no malignos

Este grupo de pólipos se denominan, genéricamente, adenomas y, con frecuencia, están asociados a síndromes polipósicos, especialmente los adenomas tubulares. Todos los pólipos neoplásicos presentan potencial

maligno, aunque la probabilidad de malignización varía en función del tipo de adenoma⁵⁵.



A.2.1. Adenoma tubular

También se denominan pólipos adenomatosos y son el tipo de adenoma más frecuente. Alrededor del 70% de todos los pólipos detectados en colon son adenomas tubulares⁵⁶.

La localización más frecuente es en colon distal y recto. El 50% son esporádicos y únicos pero en un 30-40% de los casos existen dos o más lesiones. Tienen un importante potencial de malignización que depende del tamaño del adenoma y de la proporción del componente vellosos. Los adenomas tubulares de menos de 1cm tienen un 1% de probabilidad de contener un tumor invasivo, en aquellos que miden entre 1 y 2 cm es de un 10% y en adenomas mayores de 2 cm el riesgo de malignización es del 40%⁵².

A.2.2. Adenoma vellosos

Suponen alrededor del 15% de los pólipos encontrados en colon y son aquellos que presentan más del 50% de componente vellosos. En el 75% de los casos se localizan en el recto o en la unión recto-sigma. Presentan menor tamaño que los anteriores pero su comportamiento es más agresivo, siendo el tipo de adenoma con mayor potencial de malignización. El 25-40% de los

adenomas vellosos presentan un carcinoma invasor y en el 10% de los casos existen cambios indicativos de carcinoma in situ⁵².

A.2.3. Adenoma tubulovelloso

Este tipo de pólipo neoplásico presenta características de los adenomas tubulares y vellosos. La distribución en el colon coincide con la de los adenomas tubulares y su tamaño va desde 0,5 a 5cm⁵². Además, tienen gran potencial de malignización debido a su componente velloso.

IV.A.3. Carcinoma

La OMS estableció en 1989 una clasificación de tumores colorrectales en función de su tipo histológico que ha sufrido varias revisiones hasta el año 2000⁵⁵. En esta clasificación los tumores de intestino grueso se dividen en dos grandes grupos: tumores epiteliales y tumores no epiteliales (Tabla III).

Tabla III. Clasificación histológica de tumores colorrectales según la OMS (2000)⁵⁵.

Tumores epiteliales	<ul style="list-style-type: none"> • Adenocarcinoma • Adenocarcinoma mucinoso • Adenocarcinoma de células en anillo de sello • Carcinoma de células pequeñas • Carcinoma escamoso • Carcinoma adenoescamoso • Carcinoma medular • Carcinoma no diferenciado
Tumores no epiteliales	<ul style="list-style-type: none"> • Linfoma • Lipoma • Leiomioma • Tumor del estroma gastrointestinal • Leiomiosarcoma • Angiosarcoma • Sarcoma de Kaposi • Melanoma maligno

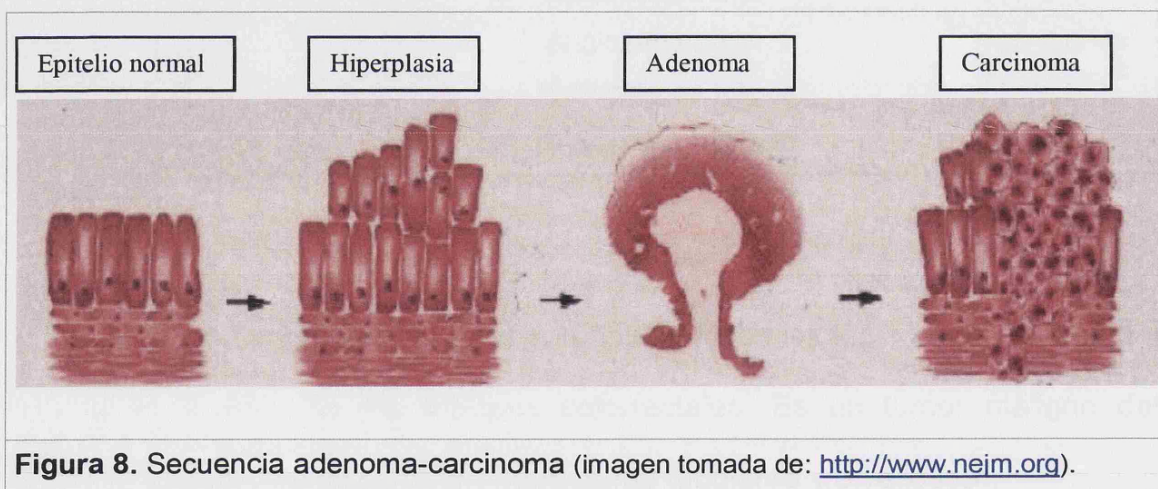
El adenocarcinoma es, con diferencia, el tipo histológico más frecuente y supone el 90-95% de los tumores colorrectales. Es un tumor maligno del epitelio glandular, compuesto por estructuras tubulares y/o vellosas.

Se denomina adenocarcinoma mucinoso cuando más del 50% de la lesión está compuesta por mucina extracelular, que se encuentra retenida en bolsas dentro del tumor. Este tipo de carcinoma supone aproximadamente el 11% del total de tumores⁵⁷.

Otro tipo de adenocarcinoma, de células en anillo de sello, se caracteriza por la presencia de más de un 50% de células con mucina intracitoplasmática. En estas células, la mucina está incluida en una vacuola que ocupa casi todo el citoplasma, desplazando generalmente el núcleo, y puede aparecer asociada a mucina extracelular o no. Es el tipo histológico menos frecuente (1-2%)⁵⁸.

V. SECUENCIA ADENOMA-CARCINOMA

En 1951 Jackman y Mayo afirmaron que el proceso de malignización desde adenoma a carcinoma constituye una secuencia de pasos bien establecidos, que va asociada a un proceso de cambios genéticos en las células de la mucosa del colon⁵⁹. La transformación neoplásica de la mucosa colorrectal es un proceso progresivo, caracterizado por una primera fase hiperproliferativa, seguida de un trastorno en la diferenciación celular (displasia), sobre el que se desarrolla un carcinoma invasor (Figura 8)⁶⁰.



Esta afirmación viene reforzada por el hecho de que en los análisis anatomopatológicos realizados en adenomas, se han encontrado focos de carcinoma, y en el análisis de carcinomas, también se han observado áreas con glándulas adenomatosas⁶¹. Además, se ha demostrado que no extirpar los

pólipos aumenta el riesgo de desarrollar CCR y que el hecho de extirparlos hace que disminuya⁶².

La mayoría de los tumores colorrectales malignos, aunque no todos, se desarrollan a partir de adenomas, que son considerados lesiones preneoplásicas benignas¹⁶. Se ha establecido que el proceso de malignización de pólipo a carcinoma puede durar varios años.

Fueron Hill et al. quienes en 1978 formularon la secuencia adenoma-carcinoma. Estos autores sugieren que los adenomas aparecen por acción de un agente medioambiental en personas con predisposición genética. En segundo lugar, actuaría otro agente medioambiental provocando la proliferación de las células del adenoma y, por acción de un agente carcinógeno, se produciría la transformación maligna. Esta hipótesis supuso la asociación de los factores medioambientales con los factores genéticos⁶³.

Posteriormente, Volgestein et al examinaron los cambios genéticos presentes en las neoplasias colorrectales y desarrollaron un modelo de carcinogénesis basado en la asociación de determinadas alteraciones genéticas y los cambios morfológicos⁶⁴. Los tumores colorrectales surgen porque en las células del epitelio se activan oncogenes y se inactivan genes supresores de tumores.

VI. VÍAS DE LA CARCINOGENÉISIS COLORRECTAL

En la actualidad se considera que el proceso de tumorigénesis se produce por la acumulación sucesiva de mutaciones en genes relacionados con la proliferación y la diferenciación celular. En el caso del CCR, las alteraciones genéticas que se suceden en las diferentes etapas están mejor caracterizadas que en otros tumores. Se considera que se debe producir la acumulación de un mínimo de entre cuatro y siete mutaciones, cada una de las cuales confiere una ventaja adaptativa⁶⁵.

Fearon y Volgestein propusieron un modelo de evolución para el CCR en el que establecen la existencia de dos vías genéticas alternativas que pueden provocar el desarrollo del CCR: la vía de la Inestabilidad Cromosómica (CIN) y la vía de la Inestabilidad de Microsatélites (MSI)⁶⁵.

La vía CIN se caracteriza por la pérdida o ganancia de regiones cromosómicas o cromosomas enteros (aneuploidía). En esta vía aparecen alteraciones en protooncogenes y genes supresores. Se calcula que alrededor del 85% de todos los CCR se desarrollan a través de esta vía de tumorigénesis, incluida la mayoría de los tumores esporádicos y todos los casos de CCR asociados a la PAF¹⁶(Figura 9).

La vía MSI se caracteriza por la acumulación de mutaciones en las secuencias microsatélites, regiones de ADN repetidas en tándem. Este

fenómeno se genera porque en estas secuencias se producen con frecuencia fallos en la replicación, que no son corregidos debido a una alteración temprana de los genes reparadores del ADN⁶⁶. Esta vía es menos frecuente en los tumores esporádicos (15%). Sin embargo, el 90% de los pacientes con CCHNP presenta mutaciones en los genes reparadores del ADN (Figura 9)⁶⁷⁻⁶⁹.

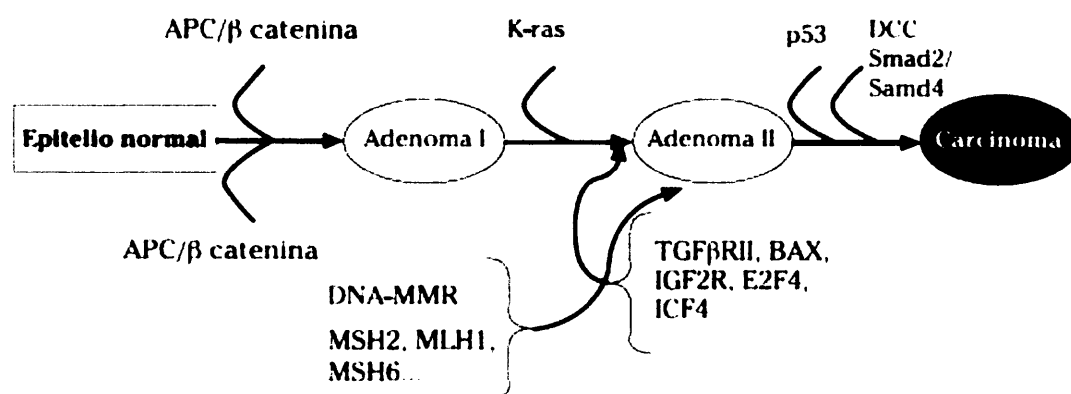


Figura 9. Secuencia de alteraciones genéticas detectadas durante la tumorigénesis colorrectal.

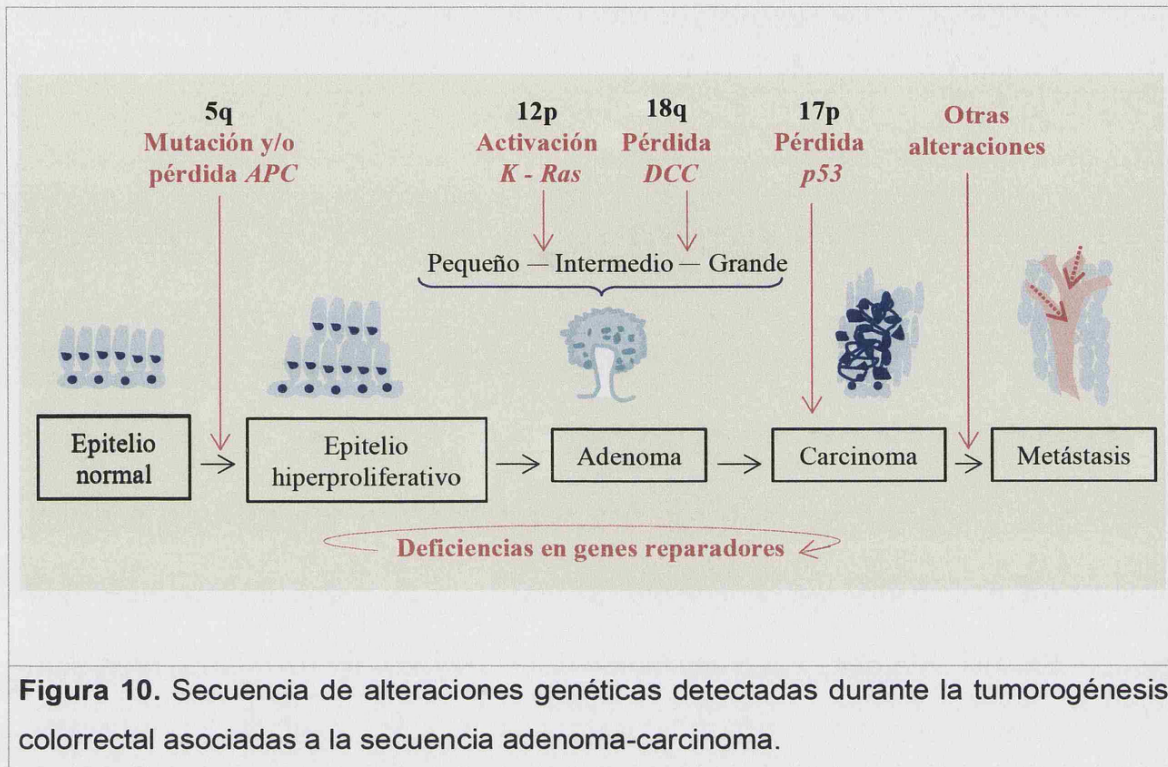
Posteriormente, en el año 2003, Lipton et al. afirmaron la existencia de un modelo alternativo de tumorigénesis para aquellos tumores que no presentan marcadores de ninguna de las dos vías anteriormente descritas. El homólogo humano del gen *mutY* de *E.coli* (*MYH*) es el responsable de un mecanismo de reparación-escisión de bases que elimina adeninas apareadas erróneamente con guaninas. Las mutaciones en este gen se asocian a un patrón de herencia recesiva de predisposición a poliposis adenomatosa cólica⁷⁰.

VI.A. Vía de la inestabilidad cromosómica (CIN)

La aparición de pérdidas o ganancias cromosómicas en esta vía está asociada a alteraciones en la proteína APC. Esta proteína está implicada en la conexión de los microtúbulos con el cinetocoro de los cromosomas y, cuando está alterada, se producen fallos en la recombinación o en la segregación cromosómica durante la mitosis⁷¹.

Se considera que las deleciones en el cromosoma 5q (gen *APC*) son la primera etapa de esta vía y pueden ser las responsables de la hiperplasia del epitelio. En un segundo paso las mutaciones de los genes Ras (frecuentemente *K-Ras*) en los adenomas se asocian a un aumento del grado de displasia. Por último, las regiones que habitualmente se alteran durante las etapas más tardías de la tumorigénesis, se localizan en los cromosomas 17 y 18, el gen *p53* (17p) y el gen delecionado en CCR (Deleted Colorectal cancer (*DCC*)) (18q) (Figura 10)^{64,72}.

Esta secuencia de eventos en la carcinogénesis no sigue siempre el mismo orden, de manera que el tumor es el resultado de la acumulación de mutaciones y no exclusivamente del orden en que se producen⁶⁴.



VI.B. Vía de la Inestabilidad de Microsatélites (MSI)

El estudio de la vía de la MSI sufrió un gran avance en 1993, cuando se publicaron varios artículos en los que se describió la implicación de esta vía en CCHNP y en CCR esporádico⁶⁶⁻⁶⁹.

Los microsatélites son secuencias cortas, entre 1 y 6 pares de bases (pb), repetidas en tándem y se encuentran distribuidas a lo largo de todo el genoma, en regiones codificantes o no codificantes de los genes. Son secuencias polimórficas en la población, es decir, la longitud de la secuencia varía de unos individuos a otros. Su estructura repetitiva hace que durante la

replicación del ADN, la polimerasa se deslice, produciéndose con frecuencia errores en la replicación¹⁰.

Cuando la ADN polimerasa introduce algún error por deslizamiento, aparece un bucle en la cadena de ADN por apareamiento incorrecto y se activa un sistema enzimático denominado “Mismatch Repair” (MMR). Las proteínas implicadas en este mecanismo de detección y corrección de errores están codificadas por genes reparadores. Este mecanismo es el mejor estudiado de reparación de los errores de un par de bases o de lazos intermedios, que surgen durante el proceso de replicación del ADN. Los genes reparadores son: *hMLH1*, *hMSH2*, *hMSH3*, *hMSH6*, *hMLH3*, *hPMS1* y *hPMS2*²².

La inactivación del sistema MMR puede producirse por diferentes alteraciones genéticas: mutación puntual, metilación de la región promotora, inserción o delección. La consecuencia de estas alteraciones es la acumulación de errores en estas secuencias repetidas, provocando la aparición de la MSI⁷³.

Distintos grupos estudiaron de la vía de la MSI empleando distintos paneles de secuencias microsatélites^{68,74,75}. En 1998 surgió la necesidad de unificar criterios y establecer un panel de secuencias microsatélite representativas, con elevada frecuencia de mutación en cáncer, con el fin de utilizarlos como marcadores. El National Cancer Institute (NCI) estableció los criterios para la determinación de la MSI. Este grupo estableció 5 secuencias microsatélite consenso para el estudio de esta vía en CCR: dos

mononucleótidos BAT25 y BAT26 y tres dinucleótidos D2S123, D5S346 y D17S250 (Tabla IV). En esta misma reunión también se estableció la clasificación de los tumores de acuerdo con la MSI: cuando el 30% o más de los marcadores estudiados presenta MSI, se define como inestabilidad de alto grado (MSI-H), por debajo de este porcentaje se denomina inestabilidad de bajo grado (MSI-L) y estabilidad de microsatélites (MSS) en el caso de que ninguno de los marcadores estudiados muestre inestabilidad⁷⁶.

Tabla IV. Oligonucleótidos repetidos de las secuencias MSI consenso.

Microsatélite	Localización cromosómica	Oligonucleótidos repetidos ^a
BAT25	4q12	TTTT.T.TTTT.(T)₇.A(T)₂₅
BAT26	2p	(T)₅.....T.(T)₄₀
D2S123	2p16	(CA)₁₃TA(CA)₁₅(T/G A)₇
D5S346	5q21/22	(CA)₂₆
D17S250	17q11.2-q12	(TA)₇.....(CA)₂₄

^a Nucleótidos no repetidos son indicados con puntos suspensivos

Las secuencias microsatélites, en muchos casos, se localizan en las regiones codificantes de protooncogenes y genes supresores de tumores. La alteración de los genes reparadores se considera un evento temprano en el proceso de tumorigénesis colorrectal, lo que provocaría la acumulación de alteraciones en estos y otros genes asociados a carcinogénesis¹⁶. El gen TGFβR2, que codifica el receptor II de TGF-β, presenta una región (A)₁₀ que presenta alteraciones con una frecuencia elevada en tumores que se desarrollan por la vía de la MSI. Otros genes como *Bax*, *TCF4*, genes que

codifican factores de transcripción como *E2F4*, etc, también presentan este tipo de secuencias y se han asociado a MSI⁷⁷.

Se han descrito características clínicas específicas en los tumores MSI-H. Este tipo de tumores presenta una localización preferentemente proximal, así como una menor tendencia a presentar metástasis y, por lo tanto, muestran un mejor pronóstico⁷⁸. Además, los tumores MSI-H se asocian a histología mucinosa, pobre diferenciación y son más frecuentes en mujeres con edad avanzada^{76,79}.

VI.C. Carcinogénesis colorrectal asociada a *MYH*

En 2002, Al-Tassan et al. descubrieron que los sujetos portadores de mutación en los dos alelos del gen *MYH* presentaban un mayor riesgo de sufrir CCR⁸⁰. Posteriormente, se detectaron mutaciones en el gen *MYH* en el 29% de los casos con adenoma múltiple (15-100 adenoma) y en el 7,5% de los pacientes con PAF (> 100 adenomas). En el 83% de los casos con PAF asociados a *MYH* se detectaron dos mutaciones que habían sido descritas anteriormente: Y165C y G382D. Las mutaciones de *MYH* predisponen a un fenotipo recesivo de PAF que se asociaría con predisposición a CCR⁸¹.

El gen *MYH* codifica una ADN glicosilasa responsable de eliminar las adeninas que por error se aparean con 8-hidroxiguanina (8oxoG). Este nucleótido es el producto de la reacción oxidativa de la guanina y, en vez de

aparearse con citosina, lo hace con adenina⁸². MYH es la enzima responsable de eliminar estas adeninas erróneas, pero si ambos alelos del gen se encuentran mutados, se produce una acumulación de transversiones G:C→T:A. Esta acumulación se ha detectado en genes asociados con la regulación del crecimiento celular como *APC* o *K-ras* y, por este motivo, se han descrito poliposis asociadas a *MYH* (MAP)⁸¹.

De acuerdo con los datos publicados por Lefevre et al, las mutaciones de *MYH* son responsables del 1,4 % de los casos de PAF y del 20% de aquellos en los que no existe mutación en el gen *APC*. Además estos autores establecen que no existen mutaciones de *APC* en los pacientes con *MYH* mutado⁸³.

VII. BASES GENÉTICAS DE LA CARCINOGENÉISIS COLORRECTAL

VII.A. Genes supresores

Los genes supresores de tumores se identificaron inicialmente por su implicación en los síndromes familiares de predisposición a cáncer. En la actualidad se sabe que juegan un papel importante también en la regulación del crecimiento en tumores de etiología esporádica.

Los genes supresores están implicados en la regulación del ciclo celular, en la parada del ciclo celular en respuesta al daño en el ADN y en la entrada de las células en apoptosis. Las mutaciones en este tipo de genes suponen la desaparición del efecto inhibitorio que ejercen sobre el desarrollo y crecimiento tumoral. En la mayoría de los casos, las alteraciones en genes supresores son recesivas y deben aparecer en los dos alelos para que se observe efecto en el fenotipo.

Uno de los genes supresores más importantes implicados en cáncer es *p53*. Este trabajo analizará la influencia de las mutaciones de este gen en el pronóstico de pacientes con CCR y, por este motivo, se detallará la información disponible de este gen supresor en una sección independiente.

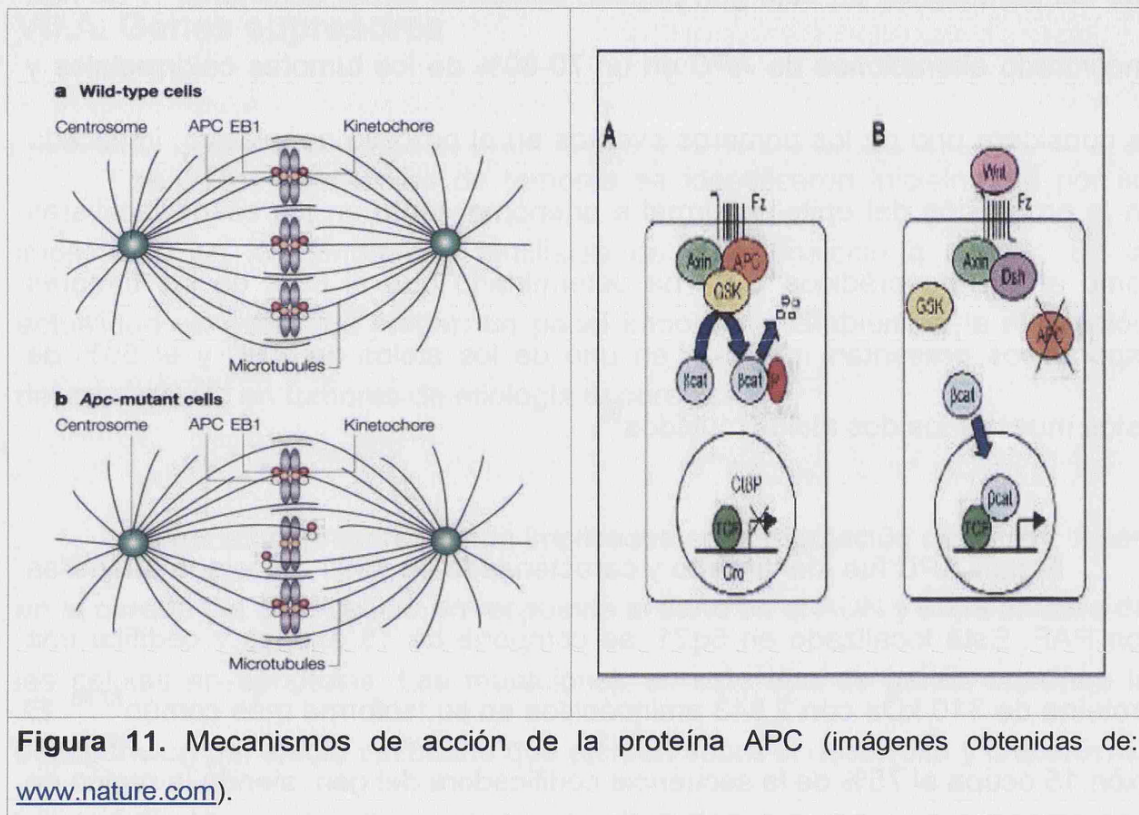
A.1. Gen *APC*

El gen *APC* resulta una excepción dentro de los genes supresores, ya que las mutaciones en este gen pueden actuar de forma dominante⁸⁴. Se han encontrado alteraciones de *APC* en un 70-80% de los tumores colorrectales y se considera uno de los primeros eventos en el proceso neoplásico, implicado en la progresión del epitelio normal a adenoma, tanto en los casos familiares como en los esporádicos⁸⁵. Se ha determinado que el 60% de los tumores esporádicos presentan mutación en uno de los alelos de *APC* y el 50% de éstos muestra los dos alelos mutados⁸⁶.

El gen *APC* fue identificado y caracterizado en 1991, asociado a familias con PAF. Está localizado en 5q21, se compone de 15 exones y codifica una proteína de 310 kDa con 2.843 aminoácidos en su isoforma más común^{87,88}. El exón 15 ocupa el 75% de la secuencia codificadora del gen, siendo la región en la que se encuentran la mayoría de las mutaciones⁸⁸.

La proteína *APC* está implicada en diversos procesos celulares. En primer lugar, en el ensamblaje de los microtúbulos en los centrómeros y segregación cromosómica, pero también en otros, como la regulación de la apoptosis y el ciclo celular, la adhesión celular o la transducción de señales. Está formada por múltiples dominios funcionales que participan en la oligomerización y permiten la interacción con otras proteínas celulares, como la β -catenina. La interacción entre *APC* y β -catenina es especialmente importante

en la regulación de la proliferación y la diferenciación de las células de las criptas colorrectales⁹⁰ (Figura 11).



A.2. Gen *DCC*

La delección de la región cromosómica 18q21 es un evento muy frecuente en CCR, se ha detectado en el 73% de los carcinomas y en el 47% de los adenomas avanzados⁶⁴. Por este motivo, muchos esfuerzos se han centrado en determinar qué genes están localizados en esta región y de qué modo se produce el efecto carcinogénico de esta pérdida cromosómica. En 1990, Fearon et al. clonaron un gen localizado en esta región y lo denominaron gen *DCC*⁹¹.

El gen *DCC* está compuesto por 57 posibles exones y 43 posibles intrones que se traducen en 13 proteínas por splicing alternativo⁹². La forma más frecuente tiene un péptido señal y 11 dominios, uno de ellos transmembrana, presentando homología con las proteínas implicadas en la adhesión celular⁹³.

La proteína codificada por *DCC* es un receptor transmembrana implicado en el crecimiento neuronal mediado por netrina-1, con actividad en otros tejidos donde actúa como receptor de dependencia⁹⁴. Cuando el ligando (netrina-1) se une a DCC, ésta activa las vías para la proliferación y migración celular. Sin embargo, en ausencia de ligando, las señales emitidas son proapoptóticas⁹⁵. Además, en las criptas intestinales se produce un gradiente de netrina-1, que solo se secreta en la base, donde se produce la proliferación, siendo muy baja la concentración en el extremo (Figura 12).

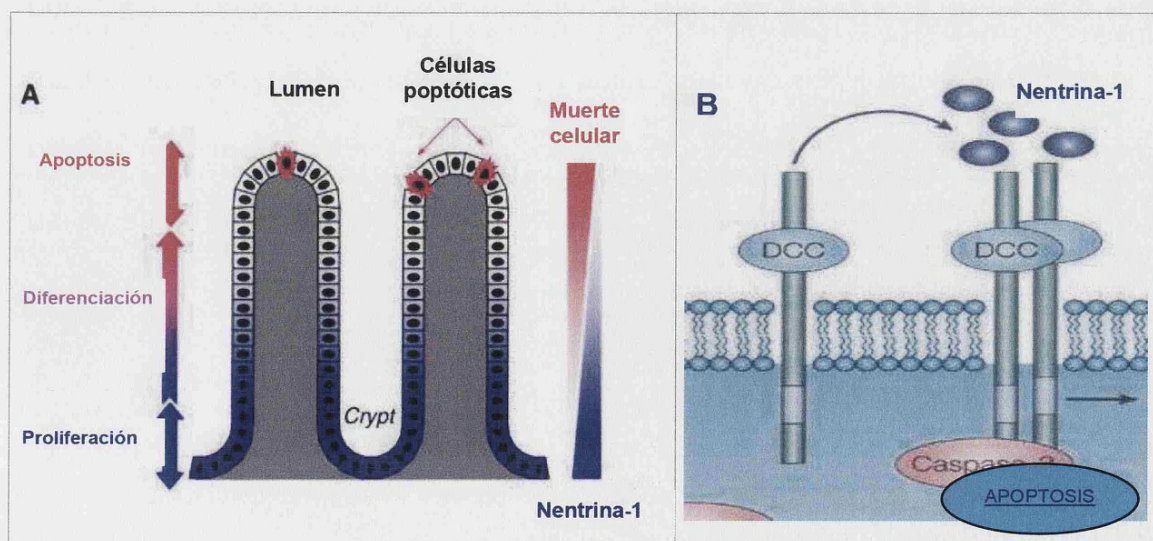


Figura 12. Mecanismos de acción de DCC. **A** Acción como receptor de dependencia en las criptas intestinales en función de la concentración de netrina-1. **B** Activación de apoptosis (imágenes tomadas de: www.nature.com).

La delección del gen *DCC* es el tipo de alteración más frecuente y provoca la inhibición de la apoptosis en las crestas de las criptas intestinales. En un pequeño porcentaje de los casos se ha detectado inactivación del gen por hipermetilación⁹⁶. La alteración de *DCC* es poco frecuente en adenomas poco avanzados y, por esto, se le ha asignado un papel promotor del crecimiento tumoral⁹⁷.

VI.B. Protooncogenes

Los protooncogenes son, en la mayoría de los casos, genes implicados en procesos de crecimiento y proliferación celular y su actividad está generalmente regulada por señales extracelulares. Las alteraciones en estos genes hacen que desaparezca la regulación sobre ellos y que permanezcan activados. Este proceso provoca la transformación en oncogenes, que favorecen la multiplicación celular ilimitada y la aparición de mecanismos para evitar la apoptosis. Las alteraciones en estos genes tienen un efecto dominante, la alteración de uno de los alelos basta para que se observe su efecto y, en la mayoría de los casos, son de origen somático.

B.1. Gen K-Ras

La familia *Ras* es una familia de protooncogenes que codifican proteínas de 21kDa (p21), con función guanosín trifosfato hidrolasas (GTPasas) y cuyos

componentes principales son: *H-RAS*, *K-RAS*, y *N-RAS*⁹⁸. Los elementos de esta familia están implicados en vías de transducción de señales asociadas a proliferación, diferenciación y senescencia. Tienen una forma activa, unida a GTP, y una forma inactiva, unida a GDP.

El homólogo del oncogen transformante del virus del sarcoma murino de Kirsten (*K-RAS*) fue descrito en 1982 por el grupo de Der et al., quien indicó que podría jugar un papel importante como oncogen en humanos⁹⁹. *K-RAS* es el principal oncogen asociado a CCR, está situado en el cromosoma 12p y codifica una proteína con dos isoformas que se diferencian principalmente en su extremo C-terminal¹⁰⁰. La activación de la proteína *K-RAS* se produce en respuesta a la estimulación de los receptores de ciertos factores de crecimiento, lo que provoca un aumento de la transcripción de genes que promueven la síntesis de ADN y la división celular¹⁰¹.

Se ha detectado una elevada frecuencia de mutaciones somáticas en leucemias, cáncer de colon, páncreas y pulmón¹⁰²⁻¹⁰⁴. La presencia de mutaciones puntuales en *K-RAS* provoca la activación constitutiva de la proteína y se traduce en una proliferación celular descontrolada. Se considera que estas mutaciones no son un evento iniciador de la tumorigénesis, pero que se produce antes de la malignización del adenoma¹⁰⁵.

Recientemente, el análisis de las mutaciones *K-RAS* han cobrado gran importancia en CCR. Se ha detectado que los pacientes con mutación

activadora del gen no responden a las terapias basadas en la inhibición del receptor del factor de crecimiento endotelial (EGFR). EGF, al interaccionar con su receptor, inicia una cadena de señales en la que está implicada K-RAS. Sin embargo, la inhibición a nivel del receptor no tiene efecto si hay una activación constitutiva de K-RAS (Figura 13)¹⁰⁶.

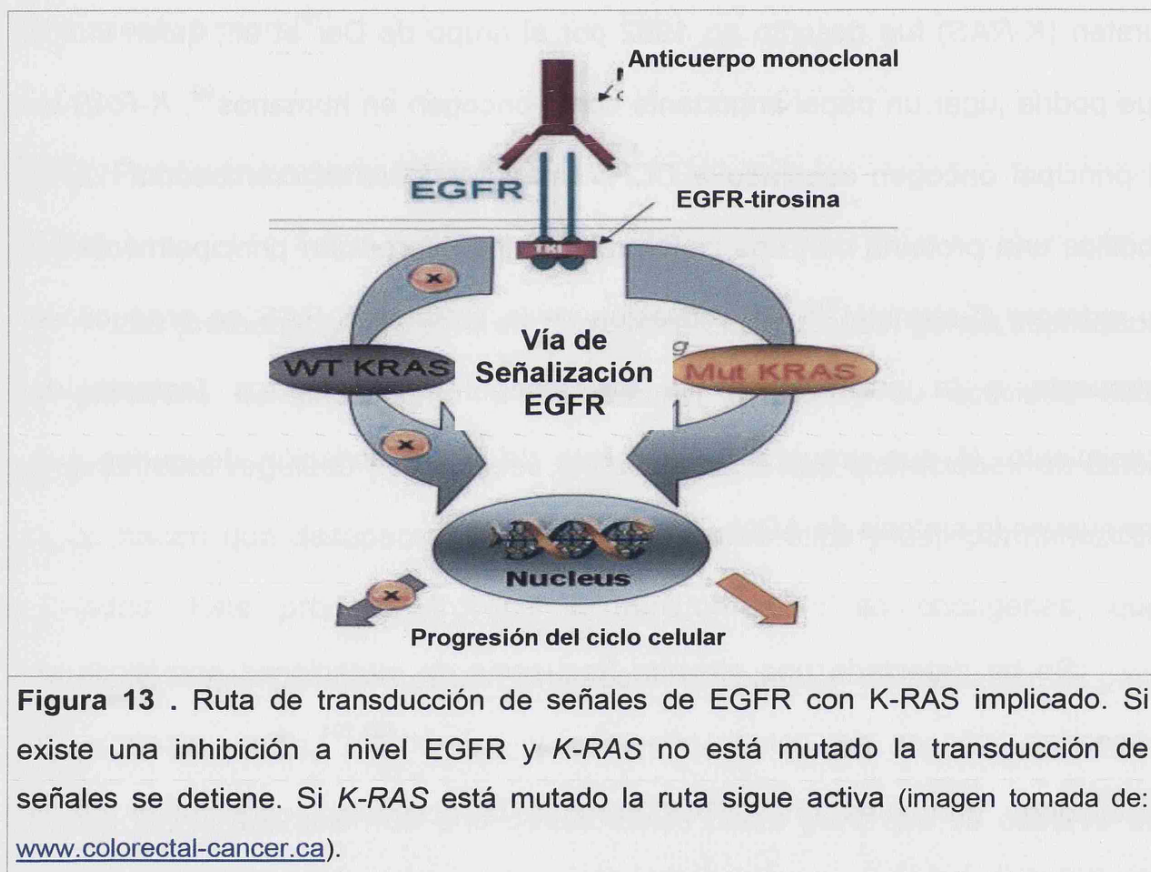


Figura 13 . Ruta de transducción de señales de EGFR con K-RAS implicado. Si existe una inhibición a nivel EGFR y K-RAS no está mutado la transducción de señales se detiene. Si K-RAS está mutado la ruta sigue activa (imagen tomada de: www.colorectal-cancer.ca).

VII.C. Sistema MMR

El sistema MMR es el encargado de detectar y corregir el apareamiento incorrecto de bases y los bucles que aparecen en el ADN cuando se produce deleción o inserción de bases durante la replicación del ADN. Este sistema está

compuesto por un complejo de proteínas, codificadas por los genes reparadores, que polimerizan entre sí para realizar su función.

La detección y unión a la región de ADN donde se encuentra el error es realizado por un heterodímero de hMSH2 con hMSH6 o hMSH3, en función del tipo de alteración. Para alteraciones de una base se necesita la unión de hMSH6 pero para la detección de lazos de tres o cuatro bases ambas proteínas pueden unirse¹⁰⁶. Una vez unido este complejo al ADN, el heterodímero formado por hMLH1 y hPMS2 coordina la interacción con otros elementos necesarios para la corrección del error como polimerasas, helicasas, etc. La proteína hMLH1 puede formar un complejo también con hMLH3, que realizaría la misma función que el anterior, pero solo en los lazos de tres o cuatro bases¹⁰⁷. Se sabe que hMLH1 también es capaz de polimerizar con hPMS1, pero la función de este complejo es poco conocida por el momento (Figura 14)¹⁰⁸.

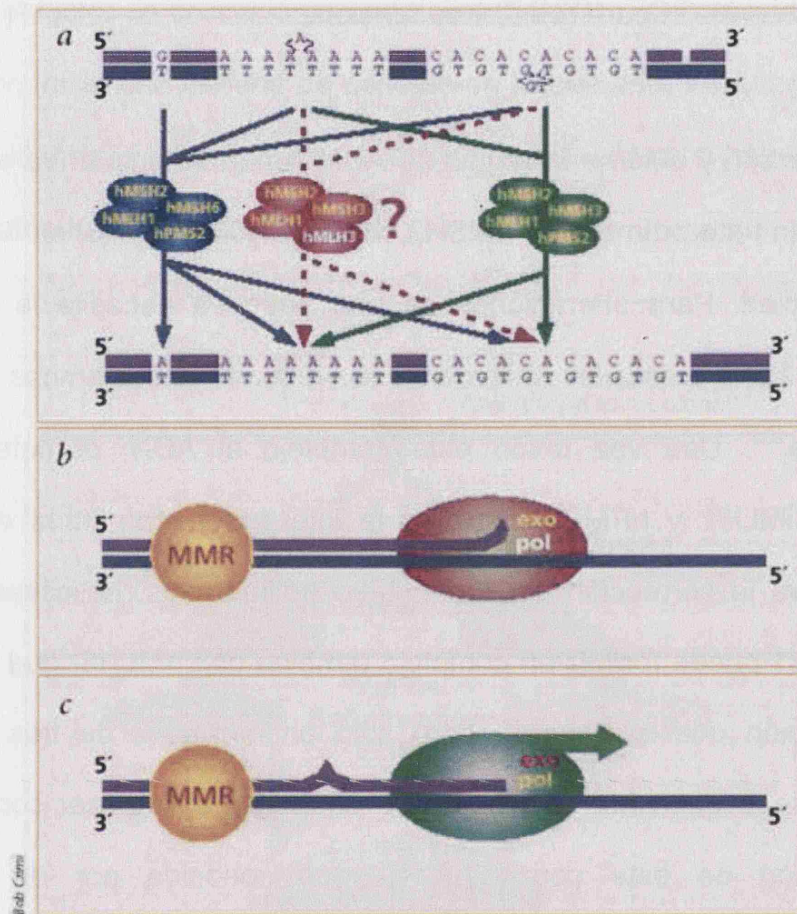


Figura 14. Mecanismo de acción del sistema enzimático de reparación de errores (imagen tomada de: www.nature.com).

Este sistema es capaz de discriminar la hebra molde de la hija. En bacterias, esta identificación se produce por la metilación, que aún no se ha producido en la hebra hija. En procariotas y eucariotas el mecanismo de identificación es más complejo y todavía no ha sido aclarado.

Las alteraciones en este tipo de genes van ligadas a la vía de tumorigénesis colorrectal de la MSI. En tumores esporádicos que se desarrollan por esta vía, el gen que se encuentra inactivado con mayor frecuencia es *hMLH1* y el mecanismo de inactivación más común es la hipermetilación del promotor¹⁰⁹. El 84% de los tumores colorrectales esporádicos con MSI presentan metilación de *hMLH1*¹¹⁰.

Además, la presencia de mutaciones germinales en los genes del sistema MMR se asocia a CCHNP. Los genes en los que se ha detectado con mayor frecuencia este tipo de mutaciones son *hMLH1* y *hMSH2*¹¹¹.

VIII. Gen *P53*

La proteína p53 fue descrita por primera vez en 1979 en el curso de los estudios realizados en células transformadas por el virus SV40. Esta proteína se clasificó inicialmente como antígeno tumoral, ya que formaba complejo con el antígeno T de SV40¹¹².

Posteriormente, p53 fue identificada en otros tipos de líneas celulares tumorales. En estas células se identificaron formas mutadas de p53 que eran capaces de inhibir la actividad de las formas normales de la proteína, comportándose como si fueran mutaciones dominantes, por lo que fue clasificado como oncogen. Sin embargo, en 1989 se verificó que p53 actuaba en realidad como gen supresor de tumores. Se descubrió que la forma no mutada de la proteína era capaz de detener el ciclo celular ante la transformación celular provocada por algunos oncogenes¹¹³.

Se han detectado mutaciones de *p53* en aproximadamente la mitad de los tumores humanos¹¹⁴. En el CCR la frecuencia de mutaciones de *p53* descritas hasta el momento es elevada. Además de su frecuencia, este gen tiene gran relevancia ya que se ha demostrado su relación con variables clinicopatológicas en diferentes tipos tumorales¹¹⁵.

VIII.A. Estructura

El gen *p53* se localiza en una región de 20Kb en el locus 17p13.1. Está compuesto por 11 exones que, mediante '*splicing*' alternativo, se transcriben en un ARN mensajero (ARNm) de entre 2,2 y 2,5 Kb. Las alteraciones en *p53* son generalmente mutaciones de cambio de sentido que dan lugar a una proteína defectuosa.

La proteína *p53* normal tiene 53.000 KDa y presenta una región específica de identificación y unión a determinadas zonas del ADN para la activación de la expresión de genes concretos. Estas regiones reguladoras, reconocidas por *p53*, se localizan en intrones o en la región 5' anterior al punto +1. La proteína también actúa como represora de la transcripción de otros genes que no presentan estas secuencias específicas. En este caso el mecanismo de acción no precisa la unión física al ADN^{114,116}.

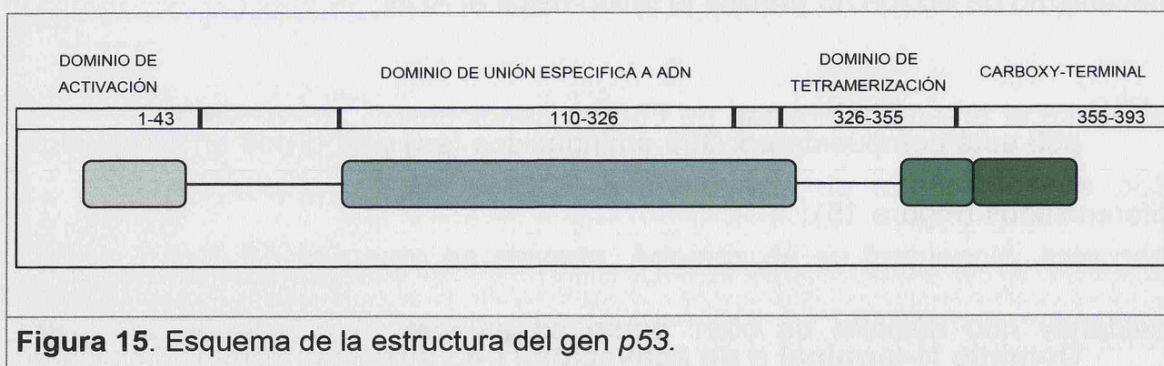
p53 está compuesta por 393 aminoácidos (aa) y se divide en 4 dominios diferenciados (Figura 15):

Dominio N-terminal o de activación (1-43 aa): Es el dominio implicado en la regulación de la expresión del gen. Existen ciertos aa en esta región que son claves en la activación o inactivación del gen. En esta región se encuentra la zona de unión de la proteína MDM2, que actúa como reguladora de *p53*.

Región de unión específica a ADN (110-286 aa): es una lámina β antiparalela que sirve de soporte, con 2 bucles de hélice α responsables de la unión física de la proteína con el ADN.

Dominio de tetramerización (326-355 aa): para su función, p53 necesita formar un tetrámero, compuesto por 2 dímeros de monómeros iguales. El ensamblaje de estos dímeros facilita la unión a la cadena de ADN o a otras proteínas. En este dominio también se encuentra la señal para ser transportada hacia el exterior.

Dominio Carboxy-terminal (355-393 aa): contiene 9 aa básicos que unen ADN y ARN dañado de forma no específica y juegan un papel importante en la regulación del ciclo celular por parte de p53. Contiene 3 señales que favorecen la localización nuclear de la proteína.



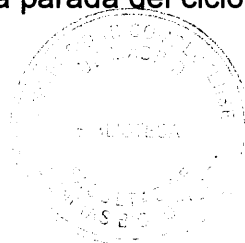
El 90% de las mutaciones de cambio de sentido ocurren en el dominio de unión al ADN. Esto hace que el reconocimiento y acoplamiento a la doble cadena sean defectuosos o bien conduce a una pérdida de la estabilidad

estructural de la proteína. Todo esto provoca la pérdida de la función supresora de tumores y, por este motivo, estas mutaciones se han asociado con frecuencia a diversos tipos de tumores¹¹⁴.

VIII.B. Regulación

La concentración de la proteína p53 en la célula es baja, debido a que presenta una vida media corta. Además, se encuentra normalmente en forma inactiva y se activa en respuesta a señales de estrés celular. Principalmente responde en casos de hipoxia y daños en el ADN, aunque también se puede activar cuando los niveles de RiboNucleosidos Trifosfato (NTPs) son bajos. Ante estas señales, se produce la activación de la proteína, aumenta su vida media y se incrementa la concentración celular¹¹⁴.

Se cree que cuando existe daño en el ADN, los intermediarios de la reparación de ácidos nucleicos activan p53 para que sea capaz de reconocer la alteración e iniciar la cadena de señales necesarias para su reparación¹¹⁷. En situaciones de hipoxia también se produce una regulación a nivel de la proteína p53, que en este caso promueve la entrada de la célula en apoptosis. Sin embargo, cuando los niveles de NTPs descienden por debajo de los niveles necesarios para la entrada de la célula en la fase de síntesis (S) del ciclo celular, la activación de p53 se produce por incremento en la expresión de la proteína. Este mecanismo de activación lleva a la parada del ciclo celular¹¹⁴.



La proteína MDM2 constituye el principal mecanismo de salida de la proteína p53 hacia el citoplasma¹¹⁸. En ausencia de señales de estrés celular, MDM2 promueve la ubiquitinación y la salida de p53 del núcleo para su posterior degradación en los proteosomas, constituyendo un sistema de autorregulación negativo^{119,120}. Además, la unión de MDM2 a la región amino terminal de p53 parece inhibir la función de esta última como factor de transcripción¹¹⁸.

VIII.C. Funciones de p53

La proteína p53 realiza una gran diversidad de funciones dentro de la célula, la mayoría de ellas relacionadas con la regulación del ciclo celular, la reparación del ADN y el control de la apoptosis. El objetivo principal de la proteína es prevenir la acumulación de daños en el ADN, deteniendo el ciclo celular para permitir la reparación o induciendo la apoptosis en aquellos casos en que el daño sea tan grave que no pueda ser reparado.

C.1. Regulación del ciclo celular: p53 es capaz de influir en el ciclo celular a través de diversas vías de regulación entre las que se encuentran: la ruta de p16-ciclina D1-quinasa 4 dependiente de ciclina(Cdk4)- retinoblastoma (Rb) y la ruta de p21^{Waf1-Cip1}.

p16-Ciclina D1-Cdk4-Rb: esta ruta regula el paso de la fase G1 a la fase S. La desregulación de este punto de control favorecerá la proliferación descontrolada de la célula. Por este motivo, al menos uno de los cuatro

componentes de la vía se encuentra alterado en la mayoría de los tipos de cáncer¹²¹.

p21^{Waf1-Cip1}: la proteína p21 es el producto del gen Waf1/Cip1 que está regulado por p53. p21 se une a diferentes complejos ciclina-cdk provocando un bloqueo del ciclo en fase G¹¹⁴.

C.2. Apoptosis: Existen numerosos mecanismos de regulación de p53 en su actividad proapoptótica, tanto a nivel transcripcional como en procesos posteriores^{114,122}. Se ha demostrado que factores como la interleuquina 6 o la eritropoyetina son capaces de inhibir el efecto apoptótico de p53 en ciertos tipos celulares^{123,124}. El gen del tumor de Wilms también está implicado en la inhibición de la apoptosis pero, además, es capaz de producir la estabilización de la proteína p53¹²⁵. Sin embargo existen otros factores que promueven esta actividad de la proteína, como la oncoproteína E7 del papilomavirus humano, la sobreexpresión de E2F-1 o del producto del oncogen myc. Cabe destacar que la entrada en la apoptosis está favorecida por protooncogenes, protegiendo de este modo a la célula del crecimiento descontrolado¹¹⁴.

Uno de los mecanismos más importantes por los que p53 es capaz de inducir la apoptosis es la activación transcripcional de Bax. Este gen pertenece a la familia de Bcl2, que codifica proteínas implicadas en promover la muerte celular programada^{126,127}.

C.3. Senescencia: se ha demostrado en experimentos con cultivos que las células van acumulando proteína p53 con los pases y que esta acumulación provoca la ralentización o la detención de la división celular. Sin embargo, en las células con p53 mutado la senescencia se pospone y aquellas en las que se ha eliminado el gen p53 no entran en estado de senescencia nunca¹²⁸.

C.4. Angiogénesis: los procesos de neovascularización tienen gran relevancia en la progresión de los tumores sólidos y en su capacidad de migración y formación de metástasis. En modelos experimentales se ha observado que p53 juega un papel regulador negativo de la angiogénesis y además, la delección de este gen en uno de los alelos se traduce en un aumento de la liberación del factor de crecimiento endotelial (VEGF)^{129,130}. El papel de p53 como inhibidor de la angiogénesis puede ser diferente en diferentes tipos de tumores, ya que, se ha demostrado que en el caso del cáncer de próstata superficial, la regulación de p53 no es crítica en el proceso de angiogénesis¹³¹.

C.5. Interacciones con proteínas codificadas por protooncogenes

- *mdm2*: es un protooncogen que actúa por diferentes mecanismos inhibiendo la actividad de p53. La proteína codificada por *mdm2* es capaz de unirse directamente a p53 impidiendo su unión al ADN, la activación de factores de transcripción, etc. Además favorece la degradación de la proteína activa por la vía de la ubiquitina^{114,121}.

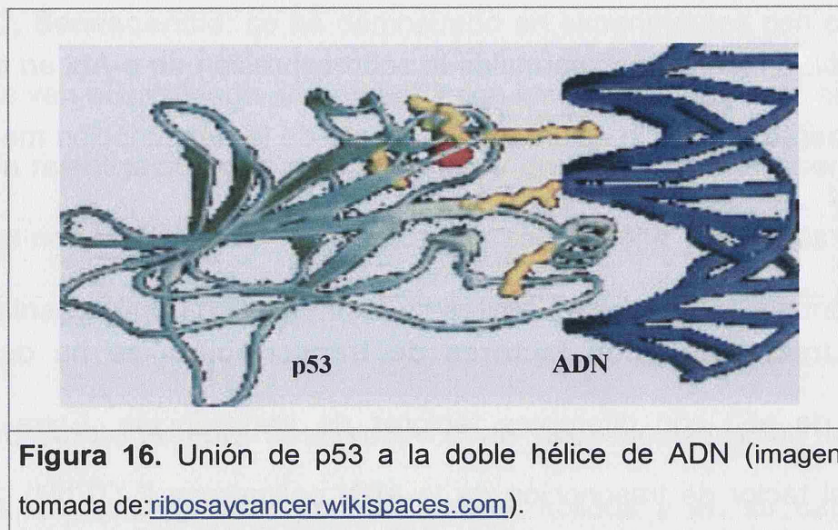
- *c-Abl*: en las células normales la sobreexpresión de *c-Abl* en el núcleo provoca la parada del ciclo celular y el aumento de la transcripción mediante la unión p53¹³².

C.6. Interacción con factores de transcripción: se ha descrito la interacción de p53 con diferentes factores de transcripción. Entre ellos se encuentra el factor de transcripción de la ARN polimerasa II (TFIIH). Se sabe que, en ausencia de este factor, no se produce la entrada en apoptosis inducida por p53.

También se ha descrito la interacción de p53 con WT1. La sobreexpresión simultánea de p53 y de WT1 provoca un aumento en la concentración de p53 activa y un incremento de la transcripción y de la unión al ADN. En modelos experimentales, este factor de transcripción es capaz de inhibir la apoptosis inducida por p53¹²⁵.

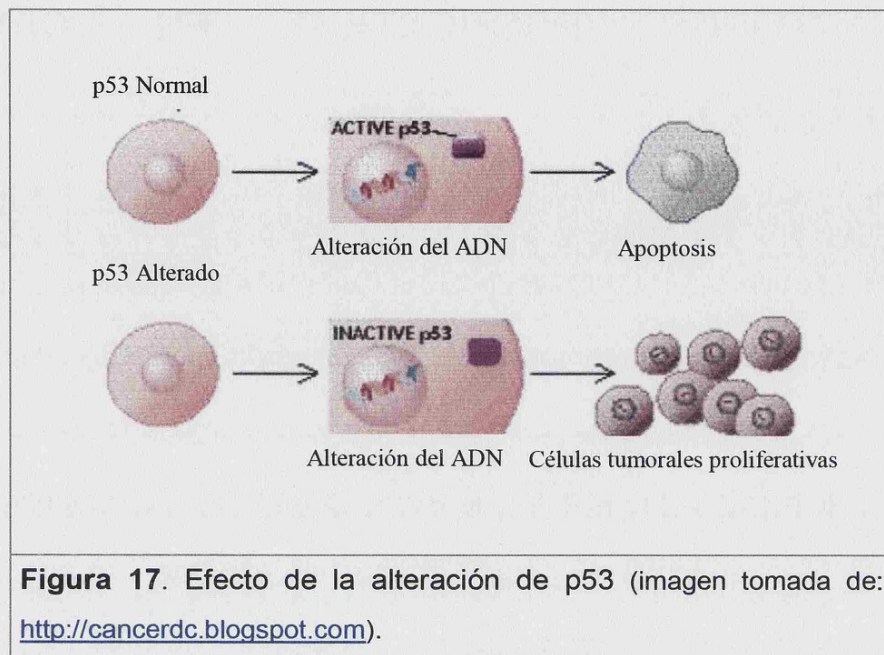
VIII.D. p53 y cáncer

Existen numerosos trabajos que han estudiado la implicación de p53 en el proceso tumoral. A nivel genético se ha observado que la mayoría de las alteraciones detectadas en el gen *p53* son mutaciones puntuales asociadas a tumores y además éstas se localizan principalmente en la región comprendida entre los exones 5 y 8, que es la región que codifica el dominio de unión de la proteína p53 al ADN (aa 102-296) (Figura 16)¹³³.



Las alteraciones del gen *p53* provocan que la proteína sintetizada presente una conformación más estable que la proteína normal, lo cual conduce a un incremento en su vida media y a su acumulación en el núcleo de las células neoplásicas¹³⁴. También se ha observado cierta resistencia a la degradación mediada por MDM2¹³⁵.

En las células con alteraciones en el gen *p53*, la replicación del ADN prosigue en presencia de un daño genómico y se generan clones de células genéticamente inestables, en las que se acumulan progresivamente las distintas alteraciones genéticas que no pueden ser detectadas ni reparadas (Figura 17)^{136, 137}.



Todo esto explica el importante papel que juega p53 en funciones vitales para el correcto funcionamiento de la célula. Por este motivo las mutaciones de p53 están implicadas en el desarrollo tumoral y provocan que la célula escape a los mecanismos de control.

La alteración del gen *p53*, observada en el 50% de los cánceres, se considera como el evento genético más frecuente en el cáncer humano. La frecuencia de alteraciones de *p53* en el cáncer llega hasta el 70% en pulmón, está entre el 40 y el 60% en colon, estómago y vejiga y es menor del 40% en mama o próstata; Sin embargo existe mucha variabilidad en los porcentajes de mutación que aparecen en las diferentes publicaciones¹³⁴.

IX. FACTORES PRONÓSTICO EN CÁNCER COLORRECTAL

Es importante tratar de predecir la evolución que tendrá el paciente para adoptar la actitud terapéutica más adecuada en cada caso. Con este fin se valoran parámetros tanto clínicos como histopatológicos para tratar de establecer la probable evolución del paciente. La herramienta más eficaz de la que se dispone en la actualidad para la predicción del pronóstico tumoral es el estadiaje histopatológico, sin embargo, cada vez aparecen más herramientas moleculares que aportan información pronóstica.

Existen características del paciente que también influyen en el pronóstico. Se ha observado un mejor pronóstico en mujeres que en hombres y un peor pronóstico en los tumores localizados en recto que en los localizados en colon^{138, 139}.

IX.A. Estadio Tumoral

La estadificación del CCR se ha aplicado desde hace décadas para predecir el pronóstico de los pacientes. Con el fin de uniformizar criterios se han establecido diferentes clasificaciones que se han vuelto cada vez más complejas con la aparición de nuevos parámetros relevantes.

En 1927 Lockarth-mummery estableció una primera clasificación, en la que dividió los tumores rectales en tres categorías en función de la infiltración tumoral en la pared. De menor a mayor infiltración se asoció con un descenso progresivo de la supervivencia¹⁴⁰.

Dukes afirmó que la distribución y diferenciación de las células en el tumor no es uniforme y, por lo tanto, esta característica no es suficiente para caracterizar el tumor. En 1930 establece su clasificación basándose en la de Lockarth-mummery¹⁴¹. Este estadiaje está basado en el grado de penetración intramural y en la invasión ganglionar y establece tres categorías (Tabla V).

Tabla V. Clasificación de Dukes inicial.

Estadio	Definición
A	Limitado a mucosa y submucosa
B	Afectación de la muscularis propia sin invasión ganglionar
C	Invasión ganglionar

En 1967 se produce otra modificación de esta clasificación en la que se incluye la categoría D, que indica la presencia de metástasis a distancia¹⁴². Esta clasificación ha sufrido otras revisiones que diferencian B1 y B2 en función de la penetración en la muscular propia y C1 y C2 en función de la penetración en la pared de los tumores con ganglios afectados.

Más recientemente, el American Joint Committee on Cancer (AJCC) ha introducido la clasificación TNM, basada en los mismos principios que la establecida por Dukes y cuyos criterios se revisan periódicamente. Las siglas corresponden a T (Tumor primario), N (afectación ganglionar) y M (Metástasis a distancia). En función de estas tres características también establecen cuatro estadios (I-IV). De acuerdo con la última revisión, publicada en 2009, los criterios de clasificación se resumen en la Tabla VI¹⁴³.

Tabla VI. Definiciones para la Clasificación TNM

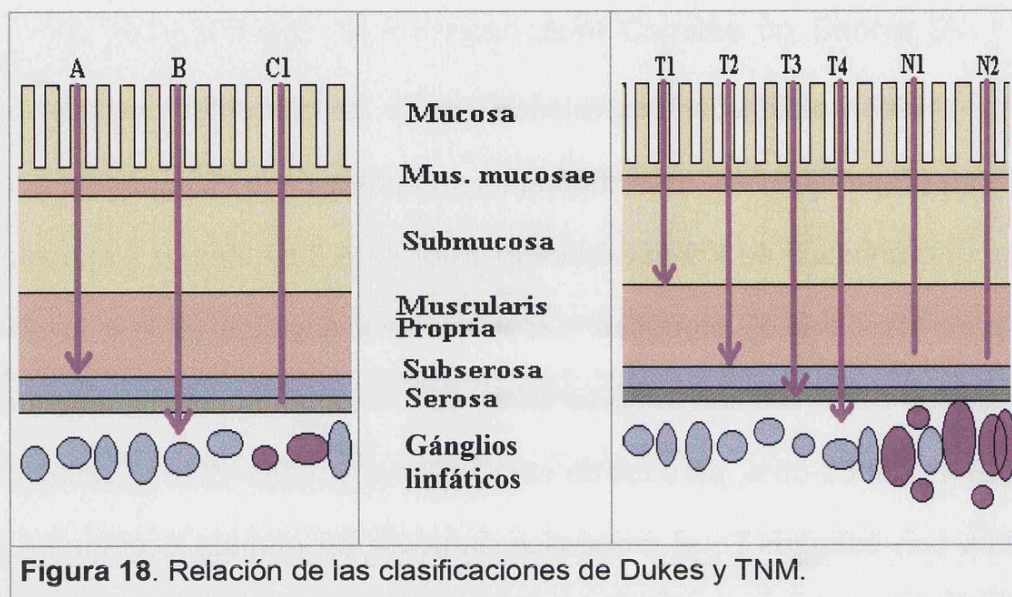
T	T _x	Tumor primario no evaluable
	T ₀	No evidencia de tumor
	T _{is}	Carcinoma in situ: intraepitelial o invasión de la lámina propia
	T ₁	Tumor que invade la submucosa
	T ₂	Tumor que invade la muscular propia
	T ₃	Tumor que invade tejido peri-colorrectal
	T ₄	Tumor que invade o está adherido a otros órganos y/o penetra en el peritoneo visceral
N	N _x	Ganglios regionales no evaluables
	N ₀	No afectación ganglionar
	N ₁	Afectación de 1-3 ganglios linfáticos regionales
	N ₂	Afectación de 4 o más ganglios linfáticos regionales
M	M _x	No se puede evaluar metástasis a distancia
	M ₀	No existen metástasis a distancia
	M ₁	Presencia de metástasis a distancia

Además de estos caracteres, dentro de la clasificación TNM se incluyen factores modificadores del pronóstico, como la invasión de vasos linfáticos, la invasión de vasos sanguíneos o la invasión perineural.

Se pueden establecer equivalencias entre las diferentes clasificaciones (Tabla VIII) (Figura 18). Además, independientemente de la clasificación que se emplee, el pronóstico de los pacientes es peor para los estadios avanzados y mejor para los estadios precoces. La supervivencia global (SG) a los cinco años para los pacientes con tumores en estadio A es del 95-100%, para los de estadio B es del 80-85%, para los de estadio C del 50-70% y, en el caso de los pacientes con estadios D, el pronóstico empeora de manera acentuada, con una supervivencia del 5-15%¹⁴⁴⁻¹⁴⁵.

Tabla VII. Relación de la clasificación TNM con la de Dukes y su relación con el pronóstico.

Dukes	Estadio TNM	Clasificación TNM		
A	0	T _{is}	N ₀	M ₀
A	I	T ₁₋₂	N ₀	M ₀
B	II	T ₃₋₄	N ₀	M ₀
C	III	T ₁₋₄	N ₁₋₂	M ₀
D	IV	T ₁₋₄	N ₁₋₂	M ₁



IX.B. Otros factores implicados en el pronóstico

De acuerdo con los criterios de la AJCC, existen otros factores que aportan información adicional al pronóstico basado en el estadio tumoral. Estos factores se detallan a continuación.

B.1. Tipo histológico

De acuerdo con la clasificación histopatológica propuesta por la OMS para el CCR, ésta no presenta valor pronóstico independiente. Sin embargo hay tipos histológicos concretos que sí están directamente asociados a peor pronóstico: carcinoma en anillo de sello, carcinoma de células pequeñas o carcinoma indiferenciado¹⁴³.

Además, algunos autores han descrito una asociación de los tumores mucinosos con estadios avanzados y una menor supervivencia^{146, 147}.

B.2. Grado de diferenciación celular

Las primeras clasificaciones tumorales, publicadas en el siglo XIX, se basaron en el grado de diferenciación. Existen en la literatura numerosos sistemas de clasificación sin que ninguno de ellos sea ampliamente aceptado. La mayoría se basan en las características arquitectónicas y citológicas del tumor pero, generalmente, el carácter al que se otorga mayor importancia es el grado de formación de glándulas.

Uno de los estudios más completos sobre la clasificación histológica es el de Grinnell, que estableció tres grados de diferenciación en función de la formación de glándulas, la polaridad del núcleo y el número de mitosis (Tabla VIII)¹⁴⁸.

Inicialmente también se estableció un cuarto grupo, los tumores indiferenciados, pero posteriormente fueron considerados una entidad histológicamente distinta por la OMS⁵⁵.

Tabla VIII. Descripción de los grados de diferenciación.

Clasificación	Descripción	Frecuencia
Grado I: Bien diferenciado	Estructura glandular bien definida, con núcleos situados cerca de la capa basal y pocas mitosis nucleares.	39%
Grado II: Moderadamente diferenciado	Disposición glandular conservada, las células con núcleos dispersos que difunden hacia los tejidos adyacentes y mayor número de mitosis que en los tumores bien diferenciados.	37%
Grado III: Poco diferenciado	Sin estructuras glandulares, sin polaridad del núcleo y con un elevado número de mitosis.	24%

Como se ha descrito anteriormente, los tipos histológicos caracterizados por menor grado de diferenciación presentan peor pronóstico¹⁴³. Sin embargo, dentro del tipo histológico más frecuente, el adenocarcinoma, el grado de diferenciación es un factor predictor de pronóstico. Los pacientes con tumores menos diferenciados muestran menor supervivencia¹⁴⁹.

B.3. Determinación del Antígeno Carcino-Embrionario (CEA)

El CEA es una glicoproteína que se expresa en el tubo digestivo del feto durante los seis primeros meses de gestación¹⁵⁰. Se ha demostrado que la presencia de niveles séricos elevados de esta proteína antes de la cirugía se asocian con un peor pronóstico dentro de cada estadio tumoral^{151,152}. CEA es un marcador tumoral no específico del CCR pero sí de tumores asociados a tracto digestivo.

La detección del CEA post-operatorio ha demostrado ser útil en el seguimiento de los pacientes: el incremento de los niveles en sangre periférica se correlaciona con la recidiva tumoral¹⁵³. Sin embargo, debido a su baja sensibilidad en estadios precoces y a la presencia de valores elevados en patologías benignas, no está recomendada su aplicación como marcador diagnóstico^{150,153,154}.

B.4. Características moleculares: MSI

Se han realizado numerosos estudios para identificar factores moleculares que ayuden a predecir el pronóstico de los pacientes con CCR. Sin embargo, de acuerdo con los resultados disponibles, la AJCC solo recomienda el uso de la MSI como factor pronóstico molecular. Los pacientes con MSI-H presentan mayor SG que los tumores con MSI-L o con MSS, tanto en tumores esporádicos como en CCHNP. Además los tumores con MSI-H presentan características histopatológicas bien definidas: localización en colon derecho y mayor frecuencia de tumores mucinosos^{155,156}.

IX.C. Nuevos factores asociados a pronóstico

La búsqueda de nuevos factores pronóstico que ayuden a mejorar la predicción del comportamiento de los tumores y la selección de pacientes para terapias cada vez más individualizadas sigue siendo uno de los retos actuales.

Existen factores que, aunque no están incluidos en los consensos internacionales, son aceptados por amplios sectores dentro de este campo y se aplican en el manejo de los pacientes. Por otro lado, otros factores están todavía en estudio y es muy probable que en un futuro se incluyan en el manejo diario de los pacientes.

La localización del tumor es uno de los factores que, de acuerdo con diferentes análisis realizados, puede tener valor pronóstico. Se ha descrito que los tumores localizados en recto o recto-sigma presentan peor supervivencia que los localizados en colon¹⁵⁷. En cuanto a la localización dentro de colon hay algunos autores que observan mejor pronóstico en los tumores localizados en colon derecho que aquellos localizados en colon izquierdo pero otros autores no encuentran diferencias en el pronóstico en función de la localización^{138,158,159}.

Otro de los factores que incluso se emplean en la rutina diaria en algunos centros es el antígeno Carbohidrato 19.9 (CA19.9). Ha demostrado sobre todo su efectividad como marcador tumoral en pacientes con adenocarcinoma pancreático¹⁶⁰. En CCR no aporta información adicional al CEA en el seguimiento de los pacientes pero también se ha demostrado que tiene valor pronóstico independiente del estadio. Los pacientes que presentan valores elevados de CA19.9 tienen peor pronóstico¹⁶¹.

En las últimas décadas, los esfuerzos por encontrar nuevos factores pronóstico se han centrado en el campo de la biología molecular. Se ha avanzado mucho en el conocimiento de los factores genéticos implicados en el desarrollo tumoral en CCR, pero se necesita traducir la información obtenida, en herramientas para mejorar el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de los pacientes.

El papel de p53 en la tumorigénesis fue descrito en 1989¹¹³. Su valor pronóstico fue estudiado inicialmente a nivel proteico, empleando técnicas de inmunohistoquímica. De acuerdo con un metaanálisis realizado por Petersen et al., la mayoría de los estudios coinciden en que la acumulación de la proteína p53 alterada tiene influencia significativa en la supervivencia libre de enfermedad (SLE) pero solo presenta una influencia marginal en la SG. Sin embargo, existen grandes diferencias en los trabajos publicados debido a diferencias en las condiciones de realización de la técnica y a la utilización de diferentes anticuerpos¹⁶². Los estudios de la mutación del gen p53 en relación con el pronóstico de pacientes con CCR resultan prometedores, aunque existen resultados contradictorios. Algunos autores han encontrado asociación entre la presencia de mutaciones en este gen y una menor supervivencia^{163,164}. Es preciso confirmar los datos disponibles de las mutaciones de p53 para verificar su aplicación en el manejo clínico de los pacientes.

Existen numerosos estudios que analizan la influencia de otras alteraciones genéticas como la mutación de *K-Ras* o del gen *DCC*. Sin

embargo, no existen evidencias suficientes, en ninguno de los casos, que permitan la inclusión de estas determinaciones en la rutina para el manejo de los pacientes con CCR.

Capítulo 2: OBJETIVOS

1. Detectar las mutaciones presentes en los exones de la región de unión al ADN del gen *p53* en una población de 344 pacientes intervenidos de CCR esporádico.
2. Determinar la frecuencia de mutación de *p53* en nuestra cohorte de pacientes con CCR. Detectar puntos calientes de mutación y realizar un análisis por exones y codones.
3. Seleccionar en nuestra población los tumores asociados a la vía de la MSI. Analizar si existe implicación del gen *p53* en esta vía de tumorigénesis.
4. Determinar la relación entre las mutaciones de *p53* o alguna mutación concreta y los factores pronóstico en el CCR.
5. Evaluar el valor pronóstico del gen *p53* en relación con la SG o la SLE.
6. Analizar si las mutaciones del gen *p53* presentan valor pronóstico independiente.

Capítulo 3: PACIENTES Y MÉTODOS

I. PACIENTES

I.A. Periodo de estudio

Este trabajo ha sido realizado en el periodo comprendido entre 2005 y 2010 y se ha desarrollado en el seno de un equipo multidisciplinar, integrado por profesionales de los Servicios de Análisis Clínicos, Cirugía II (Unidad de Coloproctología) y Anatomía Patológica del Hospital Clínico San Carlos de Madrid. Se reclutaron todos los pacientes, intervenidos consecutivamente en nuestro centro entre Marzo de 1995 y Abril de 2003, que cumplieran los criterios de inclusión y firmaron el consentimiento informado. Se realizó el seguimiento de los pacientes desde el momento de la cirugía hasta Enero de 2010.

I.B. Población de Estudio

Se trata de un estudio de cohortes prospectivo. La población del estudio comprende un total de 344 pacientes intervenidos por CCR esporádico en el Servicio de Cirugía II (Unidad de coloproctología) del Hospital Clínico San Carlos de Madrid. Todos los pacientes fueron tratados con los mismos criterios clínicos y el diagnóstico fue confirmado por el análisis histológico de la pieza de resección, realizado en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico San Carlos de Madrid. En todos los casos se confirmó la presencia de más del 80% de células tumorales.

En el reclutamiento de los pacientes se aplicaron los siguientes criterios de inclusión:

- No antecedentes personales ni familiares de CCR
- No tumores metacrónicos
- No poliposis familiar
- No criterios de HNPCC
- No enfermedad inflamatoria intestinal
- No tratamiento neoadyuvante
- Intervenidos por el mismo equipo de cirujanos

Todos los pacientes firmaron consentimiento informado previo a su inclusión en el estudio. Antes de comenzar, este estudio recibió la evaluación favorable del Comité de Ética y Ensayos Clínicos de nuestro Centro.

En lo que se refiere a la localización, se consideró colon proximal cuando los tumores estaban localizados en colon derecho y transversal y colon distal cuando afectaban a colon izquierdo y sigma. Se consideró tumor de recto cuando éste se localizó a 15 cm de margen anal como máximo.

II. MÉTODO

II.A. Metodología clínica

La valoración de los pacientes se realizó en tres etapas: preoperatoria, operatoria y postoperatoria.

- **Etapla preoperatoria:**

A todos los pacientes se les realizó anamnesis, estudios de extensión, estudios radiológicos, determinaciones analíticas básicas y colonoscopia con biopsia, informada como carcinoma de intestino grueso.

- **Etapla operatoria:**

Todos los pacientes fueron intervenidos por el mismo equipo de cirujanos, realizándose una cirugía oncológica radical en función de la localización del tumor. La cirugía se definió como curativa cuando tras la resección no existía evidencia de tumor macroscópico residual y como paliativa en caso contrario. Inmediatamente después de la resección se tomaron muestras de la zona afectada macroscópicamente por el tumor y de mucosa colorrectal sana, de una zona distanciada al menos 10 cm de la periferia del tumor. Las muestras obtenidas se lavaron con suero fisiológico para eliminar los posibles restos de sangre, grasa o heces.

Las muestras tumorales fueron divididas en dos fragmentos, uno para su conservación y análisis en nuestro laboratorio y otra se envió al Servicio de Anatomía patológica para la confirmación histopatológica.

Las muestras de tejido tumoral y no tumoral para el laboratorio fueron debidamente identificadas y se sumergieron inmediatamente en nitrógeno líquido. Posteriormente, en el laboratorio se les asignó un código y se registraron las muestras para su almacenamiento de forma ordenada, en congeladores a -80°C hasta el momento de su procesamiento.

- Etapa postoperatoria :

A todos los pacientes se les realizó un seguimiento clínico según el protocolo establecido por el equipo de cirugía, valorándose la recidiva locorregional, metástasis a distancia y otros factores clínicos. Con el fin de poder analizar el pronóstico de los pacientes, las variables clinicopatológicas se codificaron y se integraron en una base de datos.

II.B. METODOLOGÍA ANALÍTICA

II.B.1. Procesamiento de las muestras

El primer paso dentro de la metodología de laboratorio fue obtener el ADN de todas las muestras, para posteriormente cuantificar la concentración obtenida. Estas muestras se emplearon en la amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de los segmentos de interés y la detección de

mutaciones, en función de las diferencias de migración electroforética. Por último, las mutaciones detectadas se secuenciaron para la confirmación y la identificación de las mutaciones del gen *p53*.

1) Extracción y cuantificación del ADN

La extracción del ADN genómico se realizó siguiendo el protocolo del kit de extracción de ADN de Roche. Este protocolo está basado en el método químico-enzimático de extracción de ADN.

El tejido congelado se cortó en láminas muy finas y se homogeneizó en buffer de lisis frío. Se añadió proteinasa K y se mantuvo en incubación a 55°C durante toda la noche; el ADN fue extraído siguiendo etapas consecutivas de centrifugación, empleando columnas. Finalmente el ADN se recuperó en un volumen final de 400 µl de buffer de elución para su posterior cuantificación y almacenamiento.

2) Cuantificación del ADN

Se determinó la concentración y pureza de ADN por espectrofotometría. Se diluyó un pequeño volumen del ADN extraído en agua destilada para minimizar el gasto de la muestra. Se realizó la medida de absorbancia a 260 nm (D260), ya que, las bases nitrogenadas que componen esta molécula

absorben a esta longitud de onda. Una unidad de absorbancia a 260 nm corresponde a una concentración de ADN de doble hebra de 50 µg/ml ($[ADN] = D_{260} \times 50 \text{ µg/ml} \times \text{factor de dilución}$). Se realizó también la medida a 280 nm (D_{280}), la longitud de onda de absorción de las proteínas. De este modo se cuantificó la contaminación por proteínas. La muestra extraída fue considerada aceptable cuando la proporción D_{260}/D_{280} estaba entre 1,8 y 2.

Las muestras aceptadas se rotularon y se conservaron a 4°C para su utilización.

II. B.2. Detección de las mutaciones presentes en los exones 5, 6, 7 y 8 de p53.

Se decidió seleccionar una técnica de cribado que facilitara la introducción de esta técnica en la práctica clínica diaria, en caso de obtener resultados positivos. La detección de las mutaciones se realizó basándose en polimorfismos de conformación de la hebra simple de ADN (Single Strand Conformational Polimorphism (SSCP)). Esta técnica se basa en las diferencias en la conformación tridimensional de la hebra sencilla de ADN cuando se pliega por enfriamiento brusco. Diferencias en una sola base se traducen en variaciones en la conformación tridimensional que facilitan su detección en una electroforesis convencional (Figura 19).

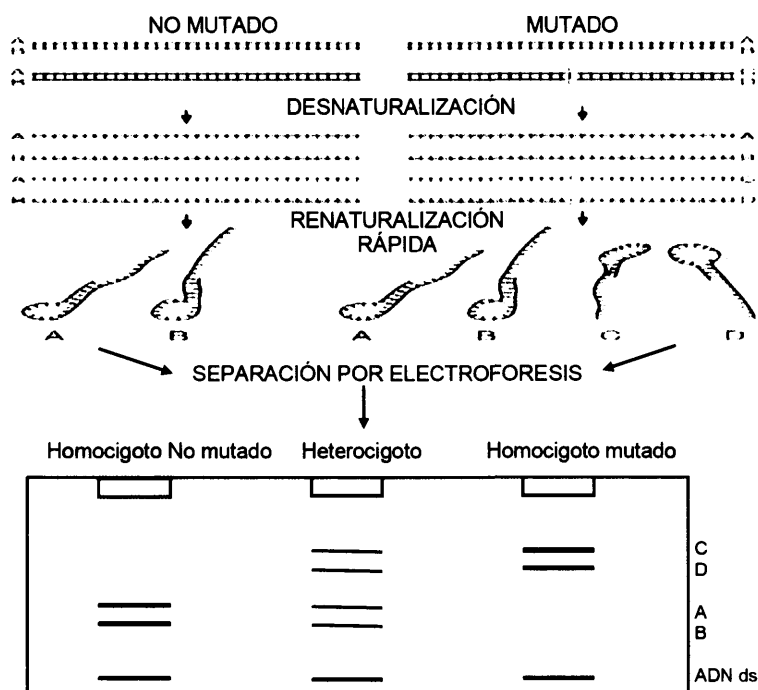


Figura 19. Esquema de detección de mutaciones por SSCP

1) Amplificación por PCR de los exones 5, 6, 7 y 8 de p53

El cribado de las mutaciones se realizó en cada exón por separado. Antes de la amplificación se realizó una búsqueda bibliográfica para seleccionar los cebadores más adecuados. Se seleccionaron las secuencias descritas por Nasierowska-Guttmejer et al.¹⁶⁵ (Tabla IX). Los cuatro exones fueron amplificados en 25 μ l de reacción, de volumen que contenía 100 ng de DNA, 200 μ M dNTP, 400 nM de cada uno de los cebadores, 2 unidades de Taq Polimerasa y buffer de amplificación 1x. La amplificación se realizó en un termociclador Perkin Elmer, con una desnaturalización inicial a 95°C durante 5 minutos. Posteriormente se programaron 40 ciclos (95 °C durante 60

segundos, (T^a de hibridación) durante 60 segundos y 72 °C durante 45 segundos) y un ciclo de elongación final a 72°C durante 10 minutos.

Tabla IX. Resumen de los cebadores específicos empleados en la PCR.

Cebador	Secuencia	Tamaño del amplificado	T^a de hibridación
Exón 5 sentido	TGT TCA CTT GTG CCC TGA CT	184 pb	57°C
Exón 5 antisentido	CAG CCC TGT CGT CTC TCC AG		
Exón 6 sentido	ACA GGG CTG GTT GCC CAG GGT	113 pb	57°C
Exón 6 antisentido	CTC CCA GAG ACC CCA GTT GC		
Exón 7 sentido	GGT CTC CCC AAG GCG CAC TGG	110 pb	61°C
Exón 7 antisentido	AGG CTG GGG CAC AGC AGG CC		
Exón 8 sentido	ATT TCC TTA CTG CCT CTT GC	137pb	52°C
Exón 8 antisentido	AAG TGA ATC TGA GGC ATA AC		

En cada tanda de amplificación se incorporó un control negativo que contenía todos los reactivos salvo el ADN, que se sustituyó por agua destilada. De este modo se descarta la posible contaminación de los reactivos.

2) SSCP

Las diferencias en movilidad de esta técnica se basan en las cualidades de la hebra sencilla y, por este motivo, las muestras se desnaturalizaron en presencia de formamida. Se tomaron 10 μ l del producto de PCR, se mezclaron con otros 10 μ l de buffer de muestra (98 % formamida, 10mM EDTA, 025% de

xylene cyanol FF) y se desnaturalizaron a 95°C durante 10 minutos, seguidos de un enfriamiento rápido en hielo. Se verificaron las diferencias en la movilidad, realizando electroforesis de las muestras desnaturalizadas en gel de poliacrilamida al 10%-12%, preparado con agua destilada, 1.6 ml de TBE a una concentración 5X, 58 µl de APS preparado al 10% p/v, 2,5-3 ml de 40% acrilamida:bisacrilamida al 40% y 3.5 µl de TEMED. La electroforesis se realizó aplicando entre 160 y 220V durante un tiempo entre 60 y 70 minutos, en función del tamaño del exón amplificado.

Para la visualización de las bandas de los amplificados, los geles fueron incubados durante 20 minutos en agitación en una disolución al 1:1000 de una solución de 0.025 g de bromuro de etidio en 50 ml TBE 1x. El bromuro de etidio se intercala entre las bases nitrogenadas, haciendo posible la visualización de los amplificados bajo luz UV con fluorescencia naranja (Figura 20).

Las muestras que presentaron movilidad electroforética alterada fueron seleccionadas para su confirmación por secuenciación.

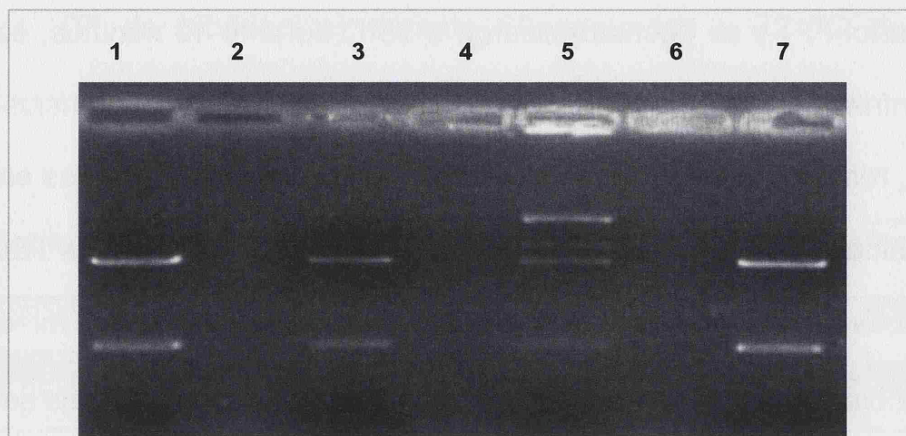


Figura 20. Ejemplo gel SSCP: exón 7. Se cargó muestra solo en los pocillos impares. Pocillo 5: mutado Pocillos 1, 3 y 7: no mutado.

II.B.3. Identificación de las mutaciones

Los amplificados con movilidad electroforética alterada fueron reamplificados utilizando un kit con los desoxinucleótidos trifosfato (dNTP) marcados diferencialmente con fluorocromos y solo uno de los cebadores en cada reacción. El protocolo de PCR fueron 25 ciclos (95 °C durante 30 segundos, 58-60°C durante 15 segundos y 60 °C durante 240 segundos).

Las muestras se purificaron por precipitación con etanol y fueron conservadas a -20°C hasta el momento de su procesamiento. La secuenciación se realizó en un secuenciador ABI PRISM 310 genetic analyzer. Las muestras fueron descongeladas, resuspendidas en formamida y desnaturalizadas a 95°C para su análisis. Los datos fueron recogidos y analizados con el software de análisis de secuenciación de Applied Biosystems.

Los resultados fueron comparados con la secuencia original por duplicado, siempre verificando la presencia de la mutación en los dos sentidos de la cadena de ADN (Figura 21).

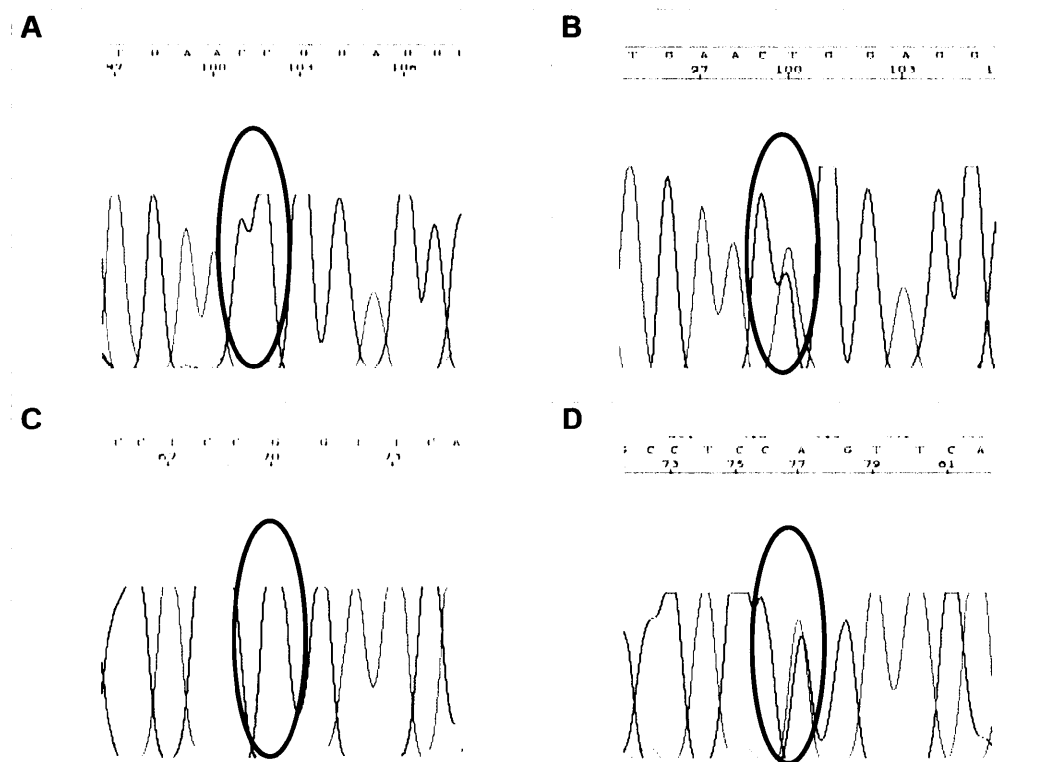


Figura 21: Ejemplo de secuenciación. Codón 248 exón 7, mutación en heterocigosis de sustitución de una Citosina por una Timina. A: sentido no mutado. B: sentido mutado. C: antisentido no mutado. D: antisentido mutado.

III.C. Metodología estadística

Se trata de un estudio de cohortes prospectivo.

Las variables clinicopatológicas incluidas en el análisis estadístico fueron:



- Edad: fue transformada en una variable cualitativa, dividiendo los individuos en función de la mediana de edad (71 años).
- Sexo
- Localización: los tumores se agruparon en colon proximal, colon distal y recto. Se definió como colon proximal la región que va desde ciego hasta colon transversal y como colon distal, la región comprendida entre la flexura esplénica y el inicio del recto.
- Tipo histológico: solo se encontraron dos tipos histológicos en nuestra población: adenocarcinoma y adenocarcinoma mucoso.
- Estadío: los tumores fueron clasificados de acuerdo con la clasificación de Dukes. Para los análisis de supervivencia se agruparon el estadio A y el estadio B debido al menor número de eventos registrados para estos dos grupos.
- Grado de diferenciación: los tumores se clasificaron en tres grupos, de acuerdo con el grado de diferenciación asignado en el análisis anatomopatológico.
- El estado de MSI también se incluyó en los análisis. Había sido previamente determinado en nuestro laboratorio en este mismo grupo de tumores. Las muestras se clasificaron en MSI-H, MSI-L o MSS, siguiendo los criterios de NCI⁷⁶.

Las variables relacionadas con el estudio de la mutación de p53 se clasificaron de tres formas:

- 1) En función del codón o triplete donde se localizó la mutación.

- 2) En función del exón donde se localizó la mutación.
- 3) En función de la presencia de mutaciones en cualquier región estudiada del gen.

Todas las variables incluidas en el estudio fueron cualitativas. En primer lugar, se realizó un análisis descriptivo de las variables que fueron presentadas con sus frecuencias.

Para determinar la relación de las mutaciones en p53 con las variables clinicopatológicas se construyeron las tablas de contingencia y se evaluó la independencia de las variables con el test de la Chi cuadrado de Pearson. En los casos en los que las dos variables fueron dicotómicas, se aplicó el estadístico de Fisher cuando más del 25% de las frecuencias era menor que 5. En el resto de las tablas en este caso se aplicó la Razón de verosimilitudes.

La mediana del tiempo de seguimiento fue de 85,9 meses con un rango intercuartílico entre $P_{25}=57,11$ y $P_{75}=107,81$ meses.

Se estimaron las funciones de supervivencia global (SG) y supervivencia libre de enfermedad (SLE) empleando el método de Kaplan Meier. En el análisis de la SG se definieron como eventos las muertes producidas como consecuencia del tumor, censurándose los pacientes vivos y aquellos que fallecieron por otras causas. La SG fue calculada como el tiempo transcurrido entre la fecha de la cirugía y la de la muerte o la última revisión registrada. En

la SLE el evento fue definido como el diagnóstico de recidiva locorregional o recurrencia a distancia en los pacientes previamente libres de enfermedad. La SLE fue calculada como el tiempo transcurrido entre la fecha de cirugía y la del diagnóstico de la primera recidiva. Se construyeron las curvas de supervivencia se compararon aplicando el test exacto de Breslow. Los resultados fueron referidos a la mediana de tiempo de seguimiento. También se aplicó un modelo de riesgos proporcionales de Cox para realizar el cálculo de "hazard ratio" (HR) y su intervalo de confianza al 95% (IC95%).

En último lugar, se realizó el análisis multivariable de las variables en las que se ha detectado efecto en el pronóstico de los pacientes. De este modo, se determinó si la variable tiene un efecto independiente o si su relación con el pronóstico esta determinado por otra variable.

En todos los contrastes de hipótesis se rechazó la hipótesis nula con un error de tipo I o error α menor a 0.05.

El paquete informático utilizado para el análisis fue SPSS para Windows versión 12.0.

Capítulo 4: RESULTADOS

I. DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN

La población del estudio comprendía 344 pacientes intervenidos por CCR esporádico. De ellos, 184 (53,5%) eran hombres y 160 (46,5%) mujeres. La media de edad de la población fue de 69,9 años, con una desviación típica de $\pm 11,2$ y una mediana de 71 años. La mediana fue empleada para la categorización de esta variable. En la población, 178 pacientes tenían 71 años o más y 166 tenían una edad menor.

En todos los casos los pacientes fueron sometidos a intervención quirúrgica. La cirugía fue realizada con intención curativa en 286 (83,1%) pacientes y con intención paliativa en 58 pacientes (16,9%).

I.A. Variables clinicopatológicas

- Localización

En relación a la localización del tumor, 206 estaban situados en colon (59,9%) y 138 en recto (40,1%). Los tumores localizados en colon se distribuían de la siguiente manera: 85 se encontraban en colon derecho (24,7%), 19 en colon transversal (5,5%), 16 en colon izquierdo (4,7%) y 86 en sigma (25,0%). De este modo 104 tumores (30,2 %) se localizaron en colon proximal y 102 (29,7%) en colon distal (Figura 22A).

- Tipo histológico

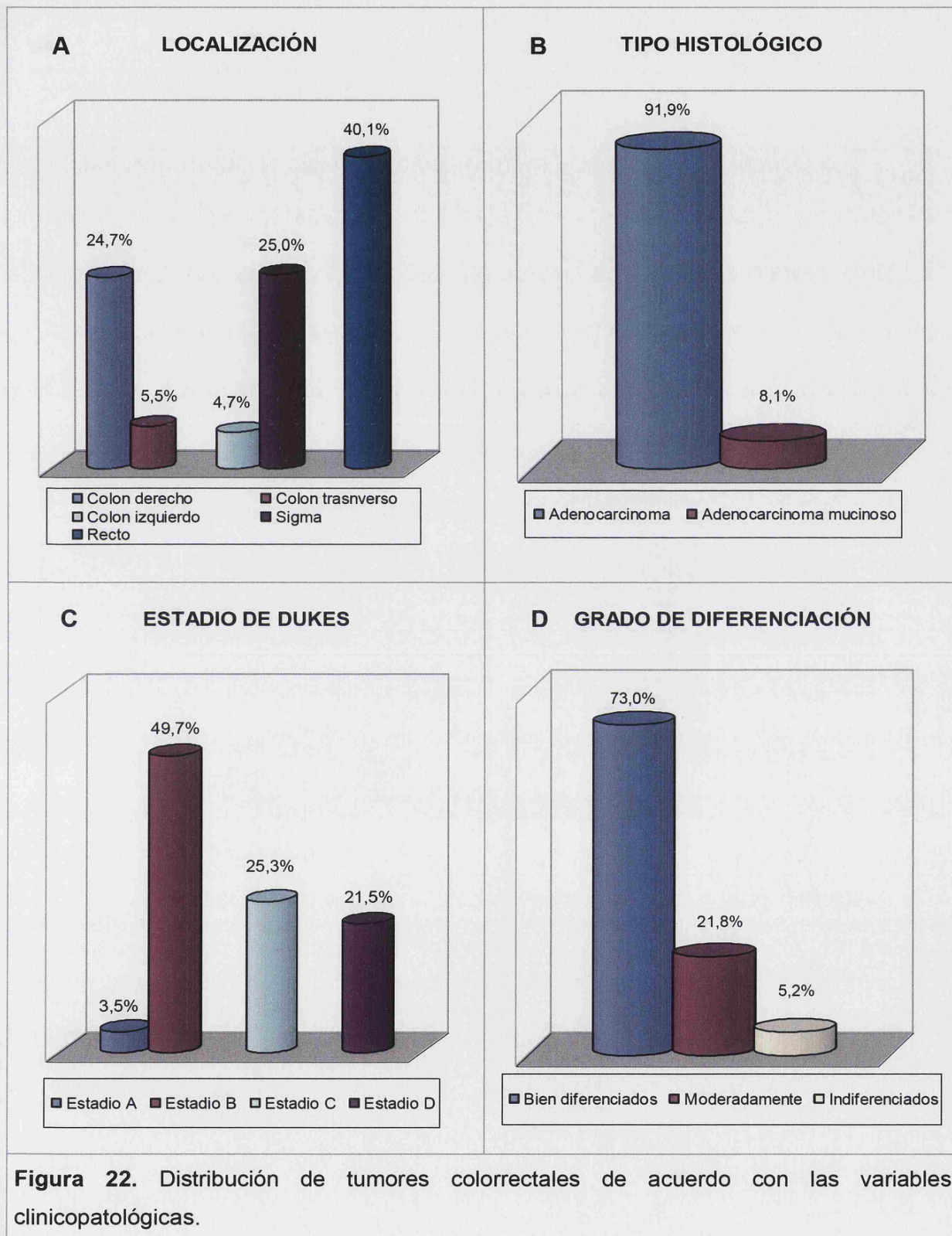
De acuerdo con la clasificación histológica establecida por la OMS en el año 2000⁵⁵, de los tumores analizados, 316 (91,9%) fueron adenocarcinomas y 28 (8,1%) fueron adenocarcinomas mucinosos (Figura 22B).

- Estadío tumoral

Los tumores de esta población se estadiaron de acuerdo con la clasificación de Dukes¹⁴¹. En función de esta clasificación, 183 (53,2%) de los tumores estaban en estadios localizados, 12 (3,5%) en estadio A y 171 (49,7%) en estadio B; 87 (25,3%) en estadio C y 74 (21,5%) en D (Figura 22C).

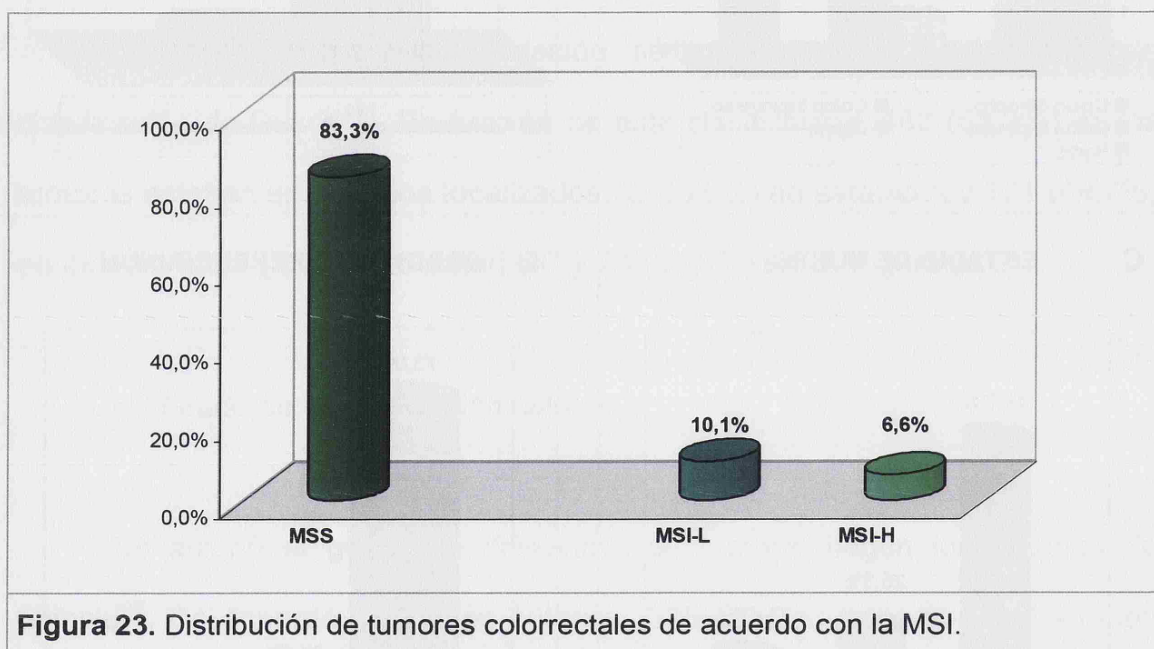
- Grado de diferenciación celular

Se asignó el grado de diferenciación tumoral según los criterios de Grinell¹⁴⁸. De acuerdo con estos criterios, 225 (73,0%) tumores estaban bien diferenciados, 67 (21,8%) moderadamente diferenciados y 16 (5,2%) indiferenciados (Figura 22D). En 36 pacientes no se pudo determinar el grado de diferenciación



I.B. Inestabilidad de microsatélites

Los tumores de la población estudiada habían sido previamente caracterizados en relación con la vía de desarrollo tumoral. En 8 pacientes no se pudo evaluar el estado de la MSI. De los 336 restantes, 280 (83,3%) no presentaban inestabilidad, 34 (10,1%) fueron MSI-L y 22 (6,6%) MSI-H.



II. ESTUDIO DE LAS MUTACIONES DEL GEN *p53*

La muestra estaba degradada en un paciente y no se pudo determinar la presencia de mutación en ninguno de los exones analizados. De las 343 muestras analizadas, en 68 pacientes (19,9%) se detectó alguna mutación en la región de *p53* evaluada. En esta población se encontraron un total de 72 mutaciones: en 4 pacientes (1,2%) se detectó más de una mutación, en 64 (18,7%) solo una mutación y 264 (80,1%) no eran portadores de ninguna mutación en la región analizada (Figura 24).

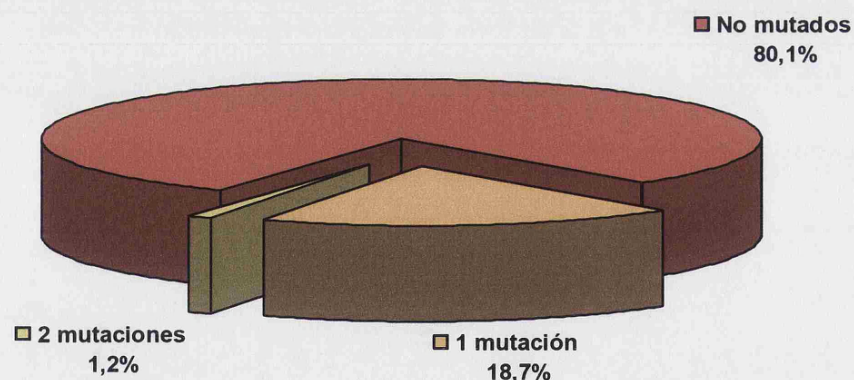


Figura 24. Distribución de los pacientes en función de la presencia y el número de mutaciones en *p53*.

Solo se detectaron mutaciones puntuales. 47 de las alteraciones detectadas (65,3%) fueron las transiciones (cambio de una purina por otra purina o una pirimidina por otra pirimidina), siendo el tipo de mutación más frecuente en esta cohorte. También se detectaron 19 (26,4%) transversiones

(cambio de un purina por una pirimidina o viceversa), 4 (5,5%) inserciones y 2 (2,8%) deleciones (Figura 25).

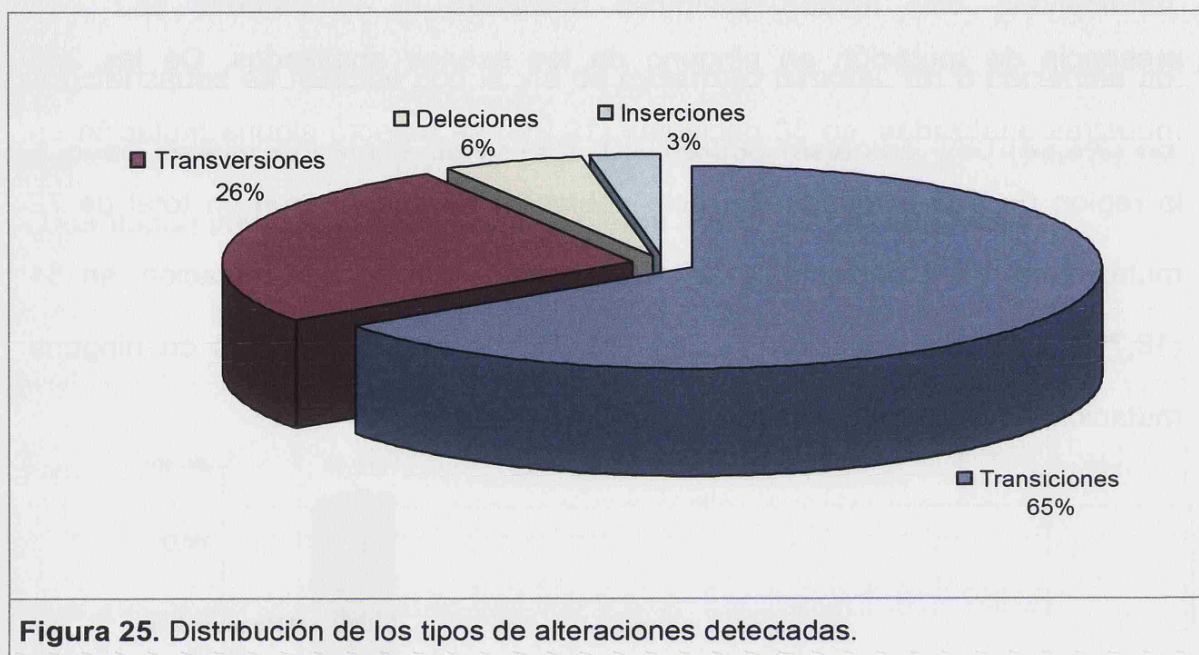


Figura 25. Distribución de los tipos de alteraciones detectadas.

En el análisis de las mutaciones por exones, se detectó una única mutación por exón.

- Exón 5

La mayor frecuencia de mutación se encontró en el exón 5, detectándose mutaciones en el 9,5% (31/327) de los pacientes (Figura 26). En 17 pacientes no se pudo analizar la mutación en este exón. La mutación detectada con mayor frecuencia en el exon 5 (61,3%) fue el cambio de G por A

en el codón 175. La mutación en este codón se detectó en el 5,8% (19/327) de los pacientes analizados.

- Exón 6

Se encontró mutación del exón 6 en el 2% (7/342) de los pacientes (Figura 26). En 2 muestras no se pudo realizar el análisis. La mutación más prevalente fue la sustitución de A por G en el codón 213. Esta alteración se detectó en el 0,6% (2/342) de los pacientes. Este codón no se incluyó como variable en los análisis estadísticos posteriores debido a la baja frecuencia de mutación registrada.

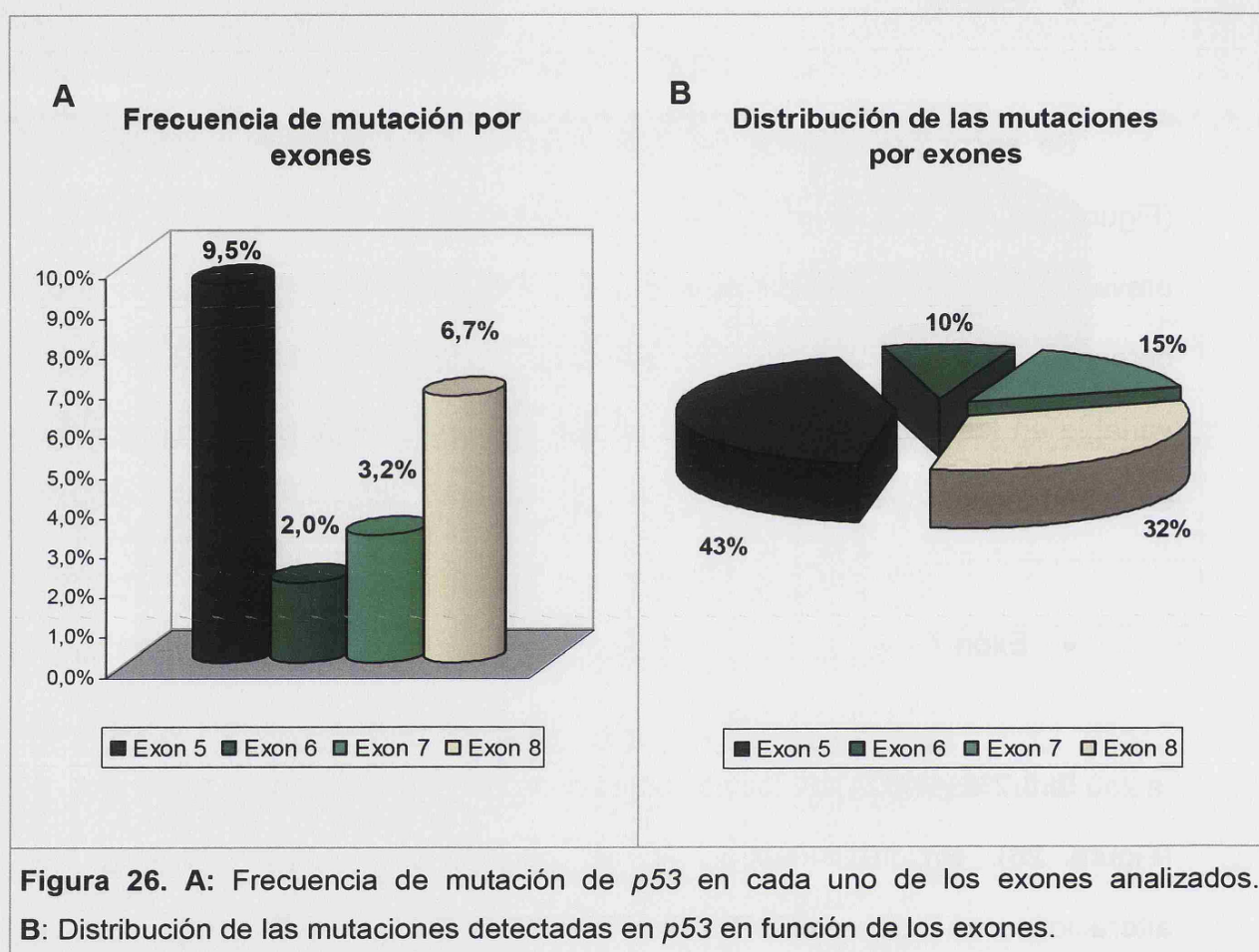
- Exón 7

El 3,2% (11/324) de los pacientes presentó alguna mutación en el exón 7 (Figura 26). En 10 muestras no se pudo determinar la presencia de alteraciones en esta región. En 6 de los 11 (1,8%) pacientes portadores de mutación para esta región, se detectó sustitución de G por A en el codón 248.

- Exón 8

En el 6,7% (23/343) de los pacientes se detectaron alteraciones en el exón 8 (Figura 26). El material genético no fue válido para el análisis en 1 muestra. Existen tres mutaciones con mayor frecuencia en este exón:

sustitución de C por T en el codón 282 (1,7%), sustitución de A por C en el codón 288 (1,2%) y sustitución de C por T en el codón 289 (1,2%).



III. ESTUDIO DE LA RELACIÓN DE LAS MUTACIONES DEL GEN *p53* CON LAS VARIABLES CLINICOPATOLÓGICAS Y LOS FACTORES PRONÓSTICO.

El estudio de las mutaciones del gen *p53* con las variables clinicopatológicas se realizó en conjunto y dividiendo las mutaciones por exones y codones.

III.A. Relación de las mutaciones del gen *p53* con las variables clinicopatológicas y los factores pronóstico.

No se detectaron diferencias significativas en la frecuencia de mutación del gen *p53* en función de los factores pronóstico (Tabla X).

Al analizar la relación de la mutación del gen *p53* con las variables incluidas en el estudio no se encontró asociación significativa con el sexo, ya que la frecuencia de mutación es casi idéntica en hombres y en mujeres. De los 184 hombres de la población, el 19,6% portaba algún alelo mutado y el 80,4% portaba el gen no mutado. En las mujeres, la frecuencia de mutación era del 20,1% y en el 79,9% no se encontró ninguna mutación ($p=0,92$).

Tabla X. Relación de la mutación del gen *p53* con las variables clinicopatológicas y los factores pronóstico clásicos. Serie de pacientes diagnosticados de CCR en el Hospital Clínico San Carlos de Madrid (Marzo 1995-Abril 2003).

Variable		n	%	Mutado		No Mutado		p
				n	%	n	%	
Sexo	Hombres	184	53,8%	36	19,6%	148	80,4%	0,92
	Mujeres	159	46,5%	32	20,1%	127	79,9%	
Edad	≥ 71 años	178	52,0%	37	20,8%	141	79,2%	0,62
	< 71 años	165	48,2%	31	18,8%	134	81,2%	
Estadio	A	12	3,5%	1	8,3%	11	91,7%	0,68
	B	171	50,0%	37	21,6%	134	78,4%	
	C	87	25,4%	16	18,4%	71	81,6%	
	D	73	21,3%	14	19,2%	59	80,8%	
Localización del Tumor	Colon proximal	104	30,4%	16	15,4%	88	84,6%	0,12
	Colon distal	102	29,8%	27	26,5%	75	73,5%	
	Recto	137	40,1%	25	18,2%	112	81,8%	
Tipo histológico	Adenocarcinoma	315	92,1%	65	20,6%	250	79,4%	0,21
	Mucoide	28	8,2%	3	10,7%	25	89,3%	
Grado de diferenciación	I	224	73,0%	41	18,3%	183	81,7%	0,58
	II	67	21,8%	15	22,4%	52	77,6%	
	III	16	5,2%	2	12,5%	14	87,50%	

Nivel de significación: $p \leq 0,05$.

La frecuencia de mutación de *p53* es muy parecida en los dos grupos de pacientes establecidos en función de la edad. En aquellos pacientes con edad igual o superior a 71 años, se detectó mutación en el 20,8% y no presentaron mutación el 79,2%. De los pacientes con menos de 71 años, el 18,8% presentaron alteración en *p53* y 81,2% no la presentaron ($p=0,62$).

En el análisis de *p53* con el estadio tumoral no se detectaron diferencias significativas. Los pacientes con tumores en estadio A presentaron una frecuencia de mutación del 8,3%, que es un poco inferior a la registrada en los otros estadios: 21,6% en estadio B, 18,4% en C y 19,2% en D. El porcentaje de individuos sin mutación fue del 91,7% en estadio A, del 78,4% en estadio B, del 81,6% en estadio C y del 80,8% en estadio D ($p=0,68$).

Se observó una mayor frecuencia de mutación del gen *p53* en los tumores localizados en colon distal (26,5%) que en colon proximal o en recto (15,4% y 18,2% respectivamente). Sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($p=0,12$). Los pacientes que no portaban mutación en el gen representaron el 73,5% de los tumores de colon distal, el 84,6% de los tumores de colon proximal y el 81,8% de los localizados en recto.

En el estudio de la relación de *p53* con el tipo histológico, se observó que en los adenocarcinomas el 20,6% de las muestras portaron alguna mutación y el 79,4% no. En los tumores de tipo mucoide el 10,7% de las muestras fueron portadoras de alguna alteración y no lo fueron el 89,3%. A pesar de que las alteraciones del gen son más frecuentes en adenocarcinomas, estas diferencias no resultaron significativas estadísticamente ($p=0,21$).

Tampoco se observaron diferencias significativas en las alteraciones de *p53* en relación con el grado de diferenciación. En los tumores bien

diferenciados se encontró mutación en el 18,3% y no se detectó en el 81,7%. En los moderadamente diferenciados se encontró mutación en el 22,4% y no la mostraron el 77,6%. En los indiferenciados la frecuencia de mutación fue del 12,5% y el 87,5% no presentaron mutación. Estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p=0,58$).

III.B. Relación de las mutaciones en los codones y en los exones del gen *p53* incluidos en el estudio con las variables clinicopatológicas y los factores pronóstico.

Se realizó el análisis detallado de las alteraciones de *p53*, en el que se incluyeron los 4 exones seleccionados para el estudio y aquellos codones con una frecuencia de mutación en esta población superior al 1%. En total, 9 variables fueron analizadas para determinar su relación con las variables clinicopatológicas (ver Anexo I). A continuación se describen las alteraciones de *p53* relacionadas con alguna de las variables clinicopatológicas incluidas en el estudio (Tabla XI).

En este análisis se detectó relación estadísticamente significativa de las mutaciones del codón 175, situado en el exón 5 de *p53*, con los tumores localizados en colon distal ($p=0,01$). En los 327 pacientes analizados, la frecuencia de esta mutación en función de la localización fue del 5% en tumores de colon proximal, el 11,3% en colon distal y el 2,3% en los tumores

de recto. Los tumores no portadores de mutación representaron el 95,0% en colon proximal, 88,7% en colon distal y 97,7% en recto (Tabla XI) (Figura 27).

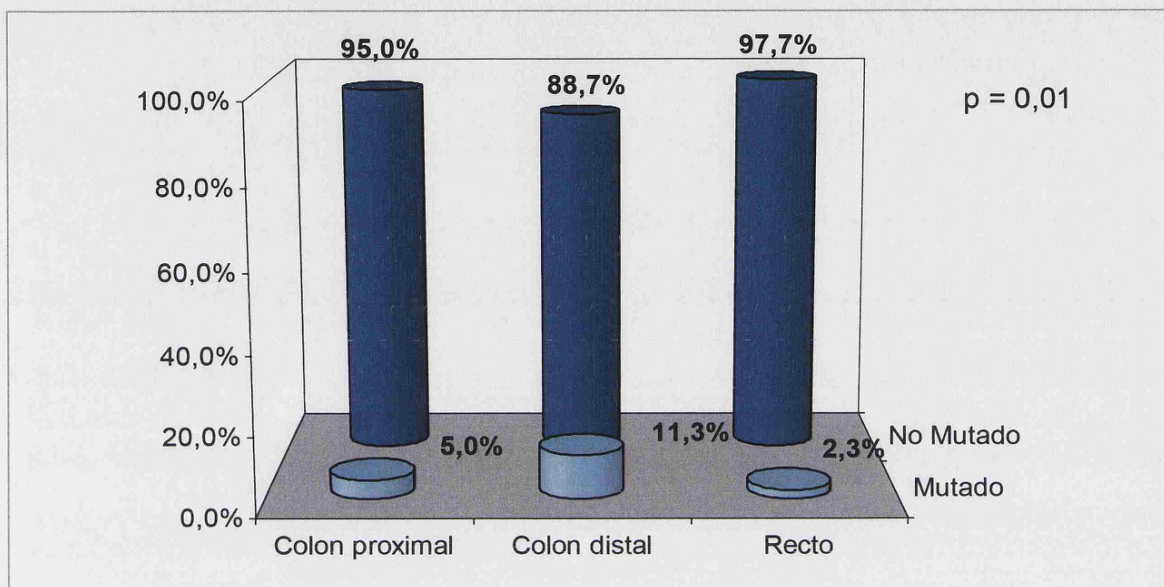


Figura 27. Distribución en porcentajes del estado de mutación del Codón 175 de *p53* en función de la localización. Serie de 327 pacientes diagnosticados de CCR en el Hospital Clínico San Carlos de Madrid (Marzo 1995-Abril 2003).

También se encontró relación de las mutaciones localizadas en el codón 288 del exón 8 del gen *p53* y la localización ($p=0,03$). El 100% de las mutaciones de este codón se detectaron en tumores de recto. El 100% de los tumores localizados en colon portaban el alelo no mutado en este codón frente al 97,1% de los localizados en recto, ya que el 2,9% de estos tumores presentó la mutación (Tabla XI) (Figura 28).

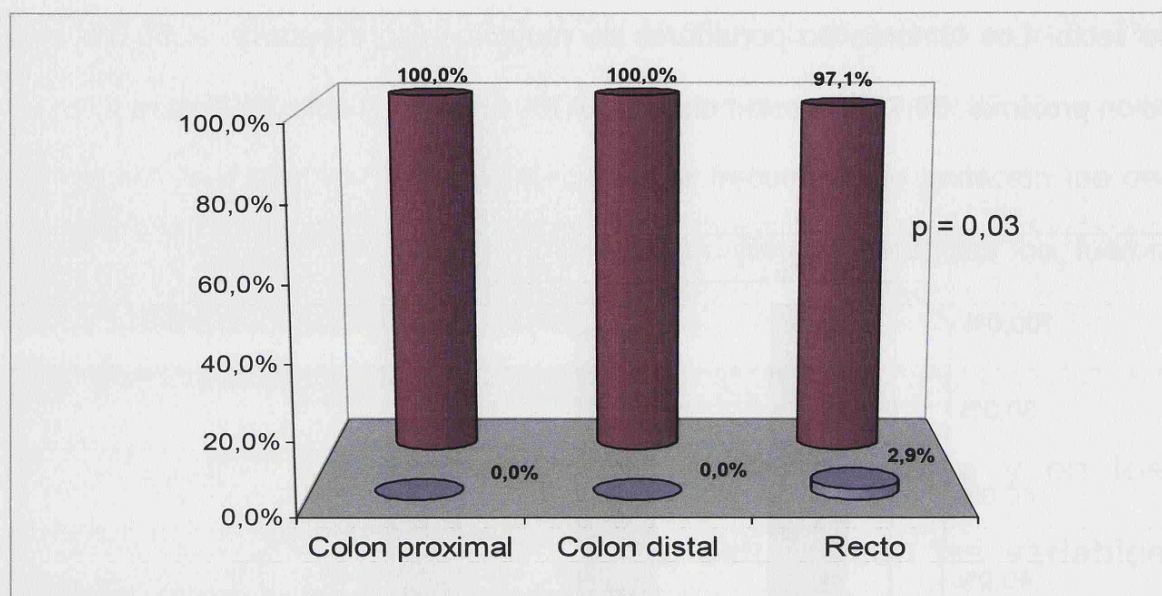


Figura 28. Distribución en porcentajes del estado de mutación del Codón 288 de *p53* en función de la localización. Serie de 343 pacientes diagnosticados de CCR en el Hospital Clínico San Carlos de Madrid (Marzo 1995-Abril 2003).

En este análisis también se determinó que existe una relación clínicamente significativa de las mutaciones detectadas en el exón 6 con el grado de diferenciación ($p=0,06$). Los tumores con mutación en este exón representaron el 1,3% de los tumores bien diferenciados, el 4,5% de los moderadamente diferenciados y el 6,3% de los indiferenciados. No tenían mutación en este exón el 98,7% de los tumores bien diferenciados, el 95,5% de los moderadamente diferenciados y el 93,8% de los indiferenciados (Tabla XI).

Tabla XI. Resumen de los resultados significativos del análisis detallado de la relación de la mutación del gen *p53* con las variables clinicopatológicas y los factores pronóstico clásicos. Serie de pacientes diagnosticados de CCR en el Hospital Clínico San Carlos de Madrid (Marzo 1995-Abril 2003).

Variable		n	%	Mutado		No Mutado		p
				n	%	n	%	
Codón 175								
Localización del Tumor	Colon proximal	101	30,9%	5	5,0%	96	95,0%	0,01
	Colon distal	97	29,7%	11	11,3%	86	88,7%	
	Recto	129	39,4%	3	2,3%	126	97,7%	
Codón 288								
Localización del Tumor	Colon proximal	104	30,4%	0	0,0%	104	100,0%	0,03
	Colon distal	102	29,8%	0	0,0%	102	100,0%	
	Recto	137	40,1%	4	2,9%	133	97,1%	
Exón 6								
Grado de diferenciación	I	224	73,2%	3	1,3%	221	98,7%	0,06
	II	66	21,6%	3	4,5%	63	95,5%	
	III	16	5,2%	1	6,3%	15	93,8%	

Nivel de significación: $p \leq 0,05$.

IV. ESTUDIO DE LA RELACIÓN DE LAS MUTACIONES EN EL GEN *p53* CON LA INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES.

Este análisis se realizó considerando, en primer lugar, todas las mutaciones detectadas en *p53* en conjunto y, posteriormente, se realizó un análisis más detallado en función de la localización de las mutaciones por exones. En último lugar, se analizaron los codones con una frecuencia de mutación superior al 1%.

IV.A. Relación de las mutaciones del gen *p53* con el estado de la MSI.

En el análisis de las mutaciones de *p53* en relación con la MSI se observó que 60 de las 65 (88,2%) mutaciones detectadas se localizaron en tumores clasificados como MSS. A pesar de esto, no existieron diferencias significativas en la frecuencia de mutación de este gen, el 21,6% de los tumores MSS estaban mutados, el 14,7% de los MSI-L y el 13,6% de los MSI-H ($p=0,25$). Las frecuencias para los tumores no mutados fueron 78,8%, 85,3% y 86,4% en tumores MSS, MSI-L y MSI-H, respectivamente (Tabla XII).

Tabla XII. Resumen de los resultados del análisis de la relación de la mutación del gen *p53* con el estado de la MSI. Serie de pacientes diagnosticados de CCR en el Hospital Clínico San Carlos de Madrid (Marzo 1995-Abril 2003).

p53 Total						
N = 334	n	%	Mutado		No Mutado	
			n	%	n	%
MSS	278	83,2%	60	21,6%	219	78,8%
MSI-L	34	10,2%	5	14,7%	29	85,3%
MSI-H	22	6,6%	3	13,6%	19	86,4%
						0,25

Nivel de significación: $p \leq 0,05$.

IV.B. Relación de las mutaciones del gen *p53* con el estado de la MSI. Análisis por exones.

Al analizar la relación de las mutaciones de *p53* con la MSI, en función de los exones donde se detectaron las alteraciones, se observó que el 16,4% de las mutaciones del exón 5 se localizaban en tumores MSI-L o MSI-H, el 0% de las del exón 6, el 27,3% de las del exón 7 y el 8,7% de las del exón 8. Al seleccionar únicamente aquellas mutaciones detectadas en tumores MSI-H, no existió ninguna alteración en los exones 6 y 7, y representaron un 6,5% en el exón 5 y un 4,3% en el exón 8.

En el análisis de las alteraciones del exón 5, la frecuencia de mutación fue muy similar en los 3 tipos de tumores, 9,6% en MSS, 9,4% en MSI-L y 9,5% en MSI-H ($p=0,97$). De este modo, los porcentajes de no mutados resultaron

también muy similares, 90,4% en MSS, 90,6% en MSI-L y 90,5% en MSI-H ($p=0,97$) (Tabla XIII).

En lo que respecta al exón 6, no se detectaron mutaciones en los tumores con MSI, solo se encontraron alteraciones en el 2,5% de los tumores MSS, frente al 97,5% de estos tumores que no la presentaron. Las diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p=0,27$) (Tabla XIII).

En relación al exón 7, no se detectó mutación en el 100% de los tumores con MSI-H, el 90,9% de los tumores MSI-L y el 97,1% de los MSS. De este modo, el exón se encontró alterado en el 9,1% de los tumores MSI-L y en el 2,9% de los tumores MSS, pero las diferencias no fueron significativas ($p=0,77$) (Tabla XIII).

Por último, tampoco se observaron diferencias en el análisis del exón 8 ($p=0,36$). Estaban mutados el 7,5% de los tumores con MSS, el 2,9% de los tumores con MSI-L y el 4,5% de los MSI-H. No portaron alteración el 92,5% de los tumores con MSS, el 97,1% de los MSI-L y el 95,5% de los MSI-H (Tabla XIII).

Tabla XIII. Resumen de los resultados del análisis por exones de la relación de la mutación del gen *p53* con el estado de la MSI. Serie de pacientes diagnosticados de CCR en el Hospital Clínico San Carlos de Madrid (Marzo 1995-Abril 2003).

Exón 5							
N = 323	n	%	Mutado		No Mutado		p
			n	%	n	%	
MSS	270	83,6%	26	9,6%	244	90,4%	0,97
MSI-L	32	9,9%	3	9,4%	29	90,6%	
MSI-H	21	6,5%	2	9,5%	19	90,5%	
Exón 6							
N = 334	n	%	Mutado		No Mutado		p
			n	%	n	%	
MSS	279	83,5%	7	2,5%	272	97,5%	0,27
MSI-L	33	9,9%	0	0,0%	33	100,0%	
MSI-H	22	6,6%	0	0,0%	22	100,0%	
Exón 7							
N = 332	n	%	Mutado		No Mutado		p
			n	%	n	%	
MSS	278	83,7%	8	2,9%	270	97,1%	0,77
MSI-L	33	9,9%	3	9,1%	30	90,9%	
MSI-H	21	6,3%	0	0,0%	21	100,0%	
Exón 8							
N = 335	n	%	Mutado		No Mutado		p
			n	%	n	%	
MSS	279	84,0%	21	7,5%	258	92,5%	0,36
MSI-L	34	10,2%	1	2,9%	33	97,1%	
MSI-H	22	6,6%	1	4,5%	21	95,5%	

Nivel de significación: $p \leq 0,05$.

IV.C. Relación de las alteraciones detectadas en los codones del gen *p53* mutados con mayor frecuencia con el estado de la MSI.

El análisis de la relación de la mutación en los codones en que se han encontrado alteraciones con mayor frecuencia con el estado de MSI se resume en la tabla XIV.

En el estudio de la relación de las mutaciones del codón 175 con el estado de MSI no encontraron diferencias significativas ($p=0,55$). De los 270 pacientes con tumores MSS, el 6,3% estaba mutado y el 93,7% solo presentó el alelo no mutado. De los MSI-L, el 3,1% fue portador de mutación y el 96,9% no lo fue. Por último, de los MSI-H portaban mutación el 4,8% y no eran portadores el 95,2%.

Tampoco se detectaron diferencias significativas en el análisis del codón 248 con la MSI ($p=0,65$). Este codón estaba mutado en el 1,4% de los tumores MSS, el 6,1% de los MSI-L y el 0% de los MSI-H. En consecuencia, no estaban mutados el 98,6% de los MSS, el 93,9% de los MSI-L y el 100% de los tumores MSI-H.

En relación con el codón 282, no se detectó mutación en el 100% de los tumores con MSI-H y MSI-L y en el 97,8% de los tumores MSS. Las frecuencia

de mutación en los tumores MSS fue del 2,2%. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p=0,30$).

No se detectó relación estadísticamente significativa de las mutaciones del codón 288 con la MSI ($p=0,40$). De modo similar al codón anterior, no se detectaron mutaciones en los tumores MSI-L y MSI-H. Solo presentó mutación el 1,4% de los tumores MSS frente al 98,6% que no la presentaron.

El codón 289 está localizado en el exón 8 como los dos anteriores y, aunque no se encontró relación con la MSI, su distribución difiere un poco de sus codones vecinos. Presentaron mutación el 4,5% de los tumores MSI-H, el 1,1% de los MSS y el 0% de los MSI-L. No presentaron ningún alelo mutado en este codón el 95,5% de los tumores MSI-H, el 98,9% de los MSS y el 100% de los MSI-L.

Tabla XIV. Resumen de los resultados del análisis por codones de la relación de la mutación del gen *p53* con el estado de la MSI. Serie de pacientes diagnosticados de CCR en el Hospital Clínico San Carlos de Madrid (Marzo 1995-Abril 2003).

Codón 175							
N = 323	n	%	Mutado		No Mutado		p
			n	%	n	%	
MSS	270	83,6%	17	6,3%	253	93,7%	0,55
MSI-L	32	9,9%	1	3,1%	31	96,9%	
MSI-H	21	6,5%	1	4,8%	20	95,2%	
Codón 248							
N = 332	n	%	Mutado		No Mutado		p
			n	%	n	%	
MSS	278	83,7%	4	1,4%	274	98,6%	0,65
MSI-L	33	9,9%	2	6,1%	31	93,9%	
MSI-H	21	6,3%	0	0,0%	21	100,0%	
Codón 282							
N = 335	n	%	Mutado		No Mutado		p
			n	%	n	%	
MSS	279	84,0%	6	2,2%	273	97,8%	0,3
MSI-L	34	10,2%	0	0,0%	34	100,0%	
MSI-H	22	6,6%	0	0,0%	22	100,0%	
Codón 288							
N = 335	n	%	Mutado		No Mutado		p
			n	%	n	%	
MSS	279	83,5%	4	1,4%	275	98,6%	0,4
MSI-L	34	10,2%	0	0,0%	34	100,0%	
MSI-H	22	6,6%	0	0,0%	22	100,0%	
Codón 289							
N = 335	n	%	Mutado		No Mutado		p
			n	%	n	%	
MSS	279	84,0%	3	1,1%	276	98,9%	0,33
MSI-L	34	10,2%	0	0,0%	34	100,0%	
MSI-H	22	6,6%	1	4,5%	21	95,5%	

Nivel de significación: $p \leq 0,05$.

V. EVOLUCIÓN POSTOPERATORIA DE LOS PACIENTES CON CARCINOMA COLORRECTAL ESPORÁDICO. ANÁLISIS DE LA INFLUENCIA PRONÓSTICA: SUPERVIVENCIA GLOBAL

V.A. Estudio de la Supervivencia Global.

En el estudio de la SG solo se consideraron como eventos las muertes ocurridas como consecuencia del tumor. La SG fue calculada como el tiempo transcurrido entre la fecha de la cirugía y la fecha de la muerte por tumor o de la última revisión registrada. En la población estudiada 115 pacientes (33,5%) fallecieron como consecuencia de su patología tumoral en el momento de la última revisión de historias.

La mediana del tiempo de seguimiento fue de 85,9 meses, con un rango intercuartílico entre $P_{25}=57,11$ y $P_{75}=107,81$ meses. Este valor es el que se tomó como referencia para el resto de los análisis de supervivencia.

La SG acumulada de los pacientes a los 85,9 meses fue del 62,7% (Figura 29).

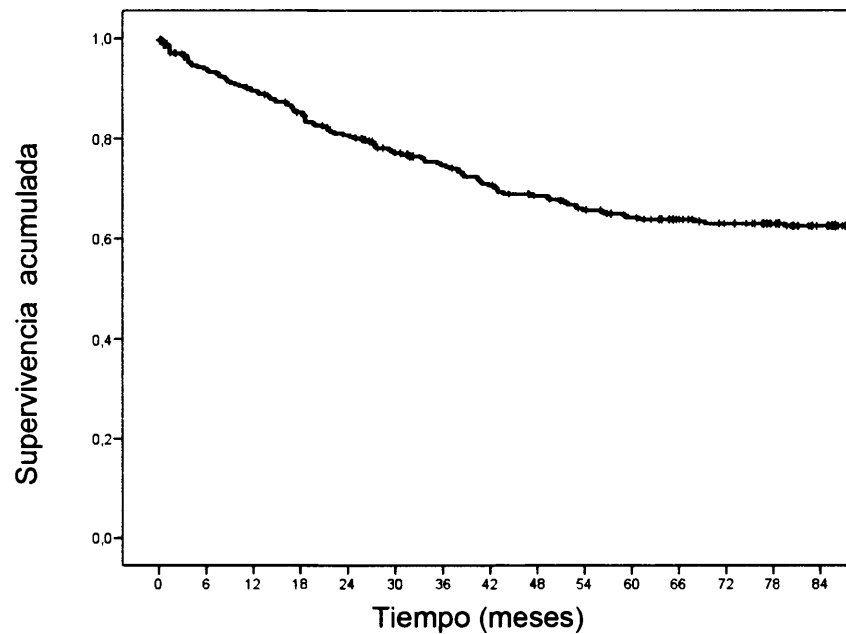


Figura 29. Curva de supervivencia global acumulada de los pacientes con CCR. Serie de pacientes diagnosticados de CCR en el Hospital Clínico San Carlos de Madrid (Marzo 1995-Abril 2003).

V.B. Análisis univariable de la probabilidad acumulada de fallecer de los pacientes con CCR, en relación con las variables clinicopatológicas y con los factores pronóstico.

Se realizó un análisis para determinar el efecto pronóstico de las principales variables clinicopatológicas y los factores pronóstico en esta población.

En la tabla XV se resume la SG de los pacientes en función de las variables estudiadas y la estimación del riesgo relativo de fallecer (HR), expresado con su correspondiente intervalo de confianza.

No se observaron diferencias en el pronóstico de los pacientes en función del sexo, los hombres presentaron una supervivencia en la mediana del tiempo de seguimiento del 60,3% y frente al 65,4% observado en las mujeres ($p=0,18$).

Con respecto a la edad, no se detectaron diferencias significativas en la supervivencia en los dos grupos creados según la edad ($p=0,12$). La supervivencia en los pacientes menores de 71 años fue 1,33 veces mayor que la de los pacientes que superaban esta edad.

De los factores pronóstico clásicos, el estadio tumoral mostró asociación significativa con la SG. El riesgo de fallecer de los pacientes en estadio D fue 20,22 veces mayor que en los pacientes en estadios A o B. El riesgo de los pacientes con estadio C fue 3,37 veces superior también con respecto a los estadios precoces ($p < 0,001$) (Figura 30).

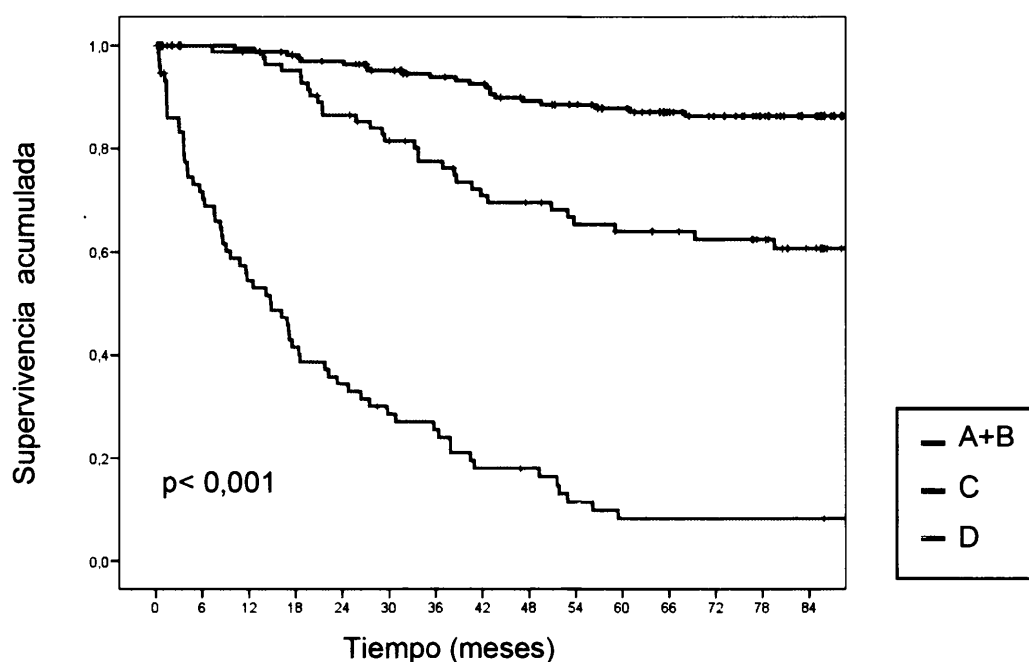


Figura 30. Curva de supervivencia global acumulada de los pacientes con cáncer colorrectal según el estadio de Dukes. Serie de pacientes diagnosticados de CCR en el Hospital Clínico San Carlos de Madrid (Marzo 1995-Abril 2003).

No se observó valor pronóstico en el análisis de la localización tumoral. Los tumores que presentaron mayor supervivencia fueron los localizados en recto, después los de colon distal con un 27% de incremento del riesgo y, por último, el colon proximal con un 49% de incremento ($p=0,20$).

Tampoco se observó significación pronóstica del tipo histológico. Los tumores clasificados como adenocarcinomas tenían una reducción del riesgo de fallecer del 39% en relación a los adenocarcinomas mucoides ($p=0,10$).

Se detectó una tendencia en el grado de diferenciación. La SG en la mediana de seguimiento de los pacientes que presentaban tumores grado I fue del 65,8% y los de grado II del 55,0% (HR=1,58), mientras que en aquellos que presentaban tumores grado III la supervivencia fue del 47,6% (HR=1,75) ($p=0,09$) (Figura 31).

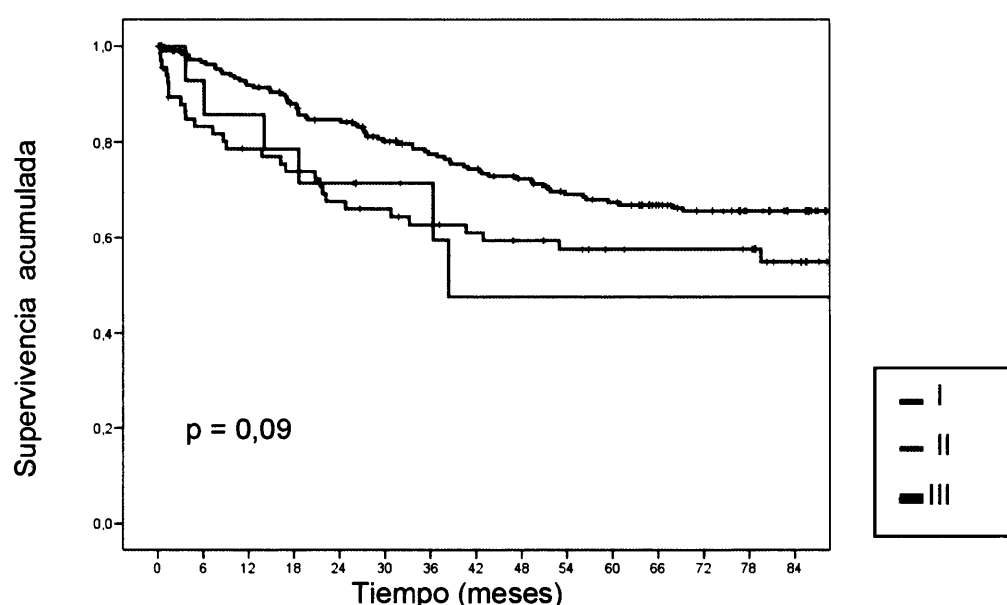


Figura 31. Curva de supervivencia global acumulada de los pacientes con cáncer colorrectal según el grado de diferenciación tumoral. Serie de pacientes diagnosticados de CCR en el Hospital Clínico San Carlos de Madrid (Marzo 1995-Abril 2003).

También se observó influencia del estado de MSI en la supervivencia de los pacientes. Los tumores MSI-H presentaron una reducción del 67% en el riesgo de fallecer con respecto a los MSS. El descenso del riesgo en los tumores MSI-L fue del 39% ($p=0,04$) (Figura 32).

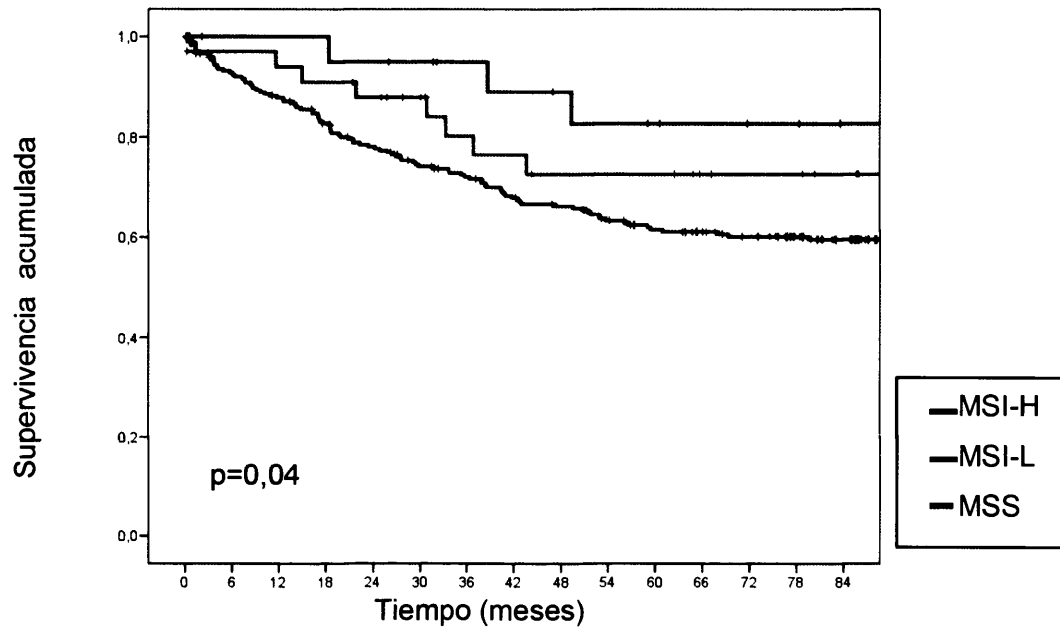


Figura 32. Curva de supervivencia global acumulada de los pacientes con cáncer colorrectal según el estado de MSI. Serie de pacientes diagnosticados de CCR en el Hospital Clínico San Carlos de Madrid (Marzo 1995-Abril 2003).

Tabla XV. Análisis univariable de la supervivencia global en relación con las variables clinicopatológicas y los factores pronóstico en la serie de pacientes con CCR diagnosticados en el Hospital Clínico San Carlos de Madrid (Marzo 1995-Abril 2003).

Variable	Categorías	SG (86 m)	HR*	IC 95%	p
Sexo	Hombres	60,3%	1,28	0,89-1,86	0,18
	Mujeres	65,4%			
Edad	≥ 71 años	58,4%	1,33	0,92-1,93	0,12
	< 71 años	66,8%			
Estadio Tumoral	A+B	86,4%	3,37	1,93-5,88 12,20-33,50	<0,001
	C	60,7%			
	D	8,2%	20,22		
Localización del tumor	Colon Proximal	57,7%	1,49	0,96-2,31	0,2
	Colon Distal	60,7%	1,27	0,81-1,99	
	Recto	67,9%			
Tipo Histológico	Adenocarcinoma	64,4%	0,61	0,35-1,06	0,1
	Mucoide	44,1%			
Grado de diferenciación	I	65,8%	1,58	1,02-2,44 0,76-4,03	0,09
	II	55,0%			
	III	47,6%			
MSI	MSS	59,7%	0,61	0,3-1,26 0,11-1,05	0,04
	MSI-L	72,6%			
	MSI-H	82,7%			

SG: supervivencia global acumulada. HR: hazard ratio. IC95%: intervalo de confianza 95%.

Nivel de significación: $p \leq 0,05$. * Los HR están ajustados por todas las variables de la tabla.

V.C Análisis univariable de la probabilidad acumulada de fallecer de los pacientes con CCR, en relación con la presencia de mutaciones en *p53*

Del mismo modo que en los análisis anteriores, se realizó el análisis de la SG en función de la mutación total de *p53* y en función de la mutación por los exones y codones (Tabla XVI).

El estudio de la mutación del gen *p53* no mostró valor pronóstico en relación con la SG. La supervivencia en la mediana del tiempo de seguimiento de los pacientes con y sin mutación fue muy similar (63,8% y 62,5%, respectivamente) ($p=0,91$).

El comportamiento de las mutaciones por exones es muy similar: no se observa valor pronóstico para ninguno de los exones analizados. Sin embargo, se han detectado diferencias significativas en la supervivencia de los pacientes en función de la presencia de mutaciones en el codón 175 ($p=0,02$). Estas mutaciones provocan una reducción del 73% en el riesgo de fallecer ($HR=0,27$) (Figura 33). El resto de codones incluidos no mostraron valor pronóstico.

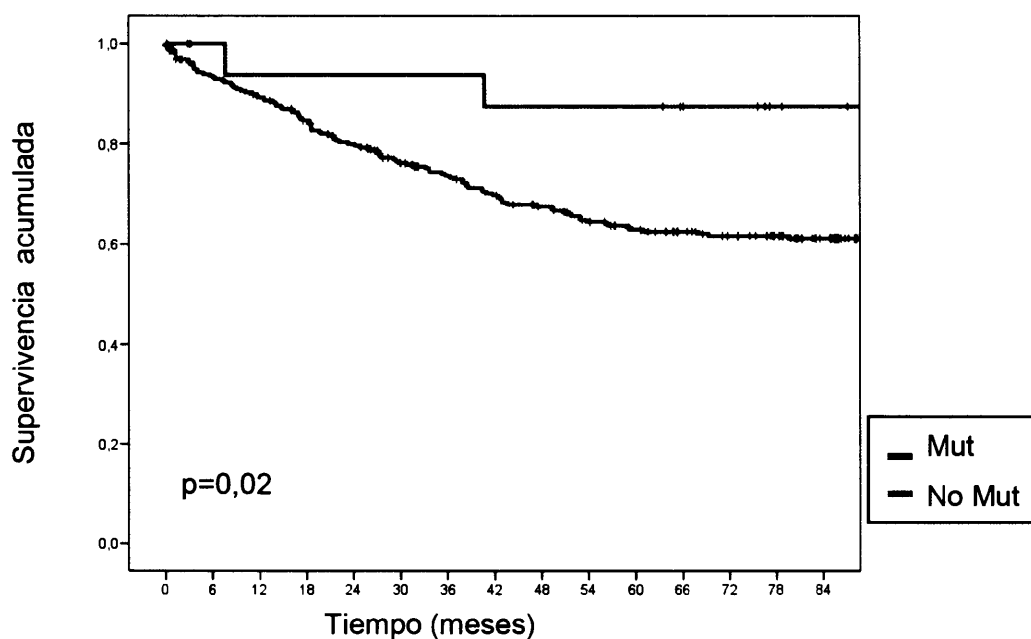


Figura 33. Curva de supervivencia global acumulada de los pacientes con cáncer colorrectal en función de las mutaciones del codón 175 de *p53*. Serie de pacientes diagnosticados de CCR en el Hospital Clínico San Carlos de Madrid. (Marzo 1995-Abril 2003).



Tabla XVI. Análisis univariable de la supervivencia global en relación con las mutaciones del gen *p53*. Serie de pacientes con CCR diagnosticados en el Hospital Clínico San Carlos de Madrid (Marzo 1995-Abril 2003).

Variable	Categorías	SG (86 m)	HR*	IC 95%	p
p53 Total	Mutado	63,8%	1,03	0,64-1,63	0,91
	No Mutado	62,5%			
Exones					
Exón 5	Mutado	67,3%	1,15	0,58-2,27	0,69
	No Mutado	61,3%			
Exón 6	Mutado	60,0%	0,98	0,24-3,96	0,98
	No Mutado	62,9%			
Exón 7	Mutado	69,3%	1,51	0,48-4,76	0,45
	No Mutado	61,7%			
Exón 8	Mutado	54,2%	0,67	0,35-1,28	0,25
	No Mutado	63,6%			
Codones					
Codón 175	Mutado	87,5%	0,27	0,07-1,11	0,02
	No Mutado	61,3%			
Codón 248	Mutado	62,5%	0,99	0,25-4,02	0,99
	No Mutado	62,7%			
Codón 282	Mutado	62,5%	1,19	0,29-4,80	0,82
	No Mutado	62,7%			
Codón 288	Mutado	50,0%	1,71	0,42-6,92	0,49
	No Mutado	62,9%			
Codón 289	Mutado	75,0%	0,77	0,11-5,54	0,79
	No Mutado	62,6%			

SG: supervivencia global acumulada. HR: hazard ratio. IC95%: intervalo de confianza 95%.

Nivel de significación: $p \leq 0,05$. * Los HR están ajustados por todas las variables de la tabla.

V.D. Análisis estratificado de la supervivencia global en función de las mutaciones del gen *p53*.

Se analizó la SG de los pacientes de la cohorte, en cada uno de los grupos de las variables clinicopatológicas, estratificando en función de la presencia, o no, de mutaciones en el gen *p53*. Este análisis también se realizó, en primer lugar, considerando las alteraciones en conjunto y, después, en función del exón y el codón donde se localizaron (ver Anexo II). Se resumen en la tabla XVII las variables en las que se detectó valor pronóstico y en aquellas en las que se detectó tendencia hacia una significación pronóstica ($p < 0,1$).

Se observó que la presencia de mutaciones en el gen *p53* originaba diferencias en el pronóstico de los pacientes con tumores localizados en colon. Se estableció que la presencia de mutación en los tumores de colon proximal suponía una reducción de la supervivencia. Sobrevivieron el 41,4% de los pacientes con mutación, frente al 60,5% de los que no la tenían ($p = 0,05$). Sin embargo, en los tumores de colon distal la presencia de la mutación presentó tendencia hacia un efecto protector ($p = 0,06$).

Tabla XVII. Resumen del análisis estratificado de la supervivencia global en función de las mutaciones del gen *p53*. Variables en las que se obtuvo un nivel de significación inferior a 0,1. Serie de pacientes diagnosticados de CCR en el Hospital Clínico San Carlos (Marzo 1995-Abril 2003).

Variable	Estado	SG (86 meses)	p
p53 Total			
Colon proximal	Mutado	41,4%	0,05
	No Mutado	60,5%	
Colon distal	Mutado	74,2%	0,06
	No Mutado	56,0%	
Exón 5			
Colon distal	Mutado	91,7%	0,03
	No Mutado	57,6%	
Codón 175			
Hombre	Mutado	100,0%	0,05
	No Mutado	58,4%	
< 71 años	Mutado	100,0%	0,05
	No Mutado	64,8%	
Colon distal	Mutado	88,9%	0,09
	No Mutado	57,6%	
Adenocarcinoma	Mutado	86,7%	0,09
	No Mutado	63,2%	
MSS	Mutado	85,7%	0,07
	No Mutado	58,0%	
Exón 8			
Hombre	Mutado	35,7%	0,09
	No Mutado	62,5%	
< 71 años	Mutado	50,0%	0,07
	No Mutado	68,4%	
Colon proximal	Mutado	19,0%	0,01
	No Mutado	60,5%	
Mucinoso	Mutado	0,0%	0,01
	No Mutado	45,9%	
Codón 282			
Colon proximal	Mutado	0,0%	0,04
	No Mutado	58,3%	
Moderadamente diferenciado	Mutado	0,0%	0,01
	No Mutado	56,8%	
Codón 289			
Hombre	Mutado	0,0%	0,05
	No Mutado	60,6%	

SG: supervivencia global acumulada. Nivel de significación: $p \leq 0,05$. Tendencia: $p < 0,1$

En relación al exón 5, también se detectó un aumento en la SG de los pacientes con tumores localizados en colon distal y que eran portadores de la mutación. Los pacientes con mutación presentaron una supervivencia del 91,7%, frente al 57,6% de los no portadores ($p=0,03$).

Se observaron implicaciones pronósticas de las mutaciones localizadas en el codón 175 del exón 5 en algunos subgrupos. Estas mutaciones presentaron un efecto protector en todos los casos. Se detectó un aumento de la SG con respecto a la presencia de la mutación en los varones y en el grupo de menores de 71 años. Sobrevivieron el 100% de los hombres con este exón mutado y el 58,4% de los que portaban el alelo normal ($p=0,05$). De los pacientes menores de 71 años sin la mutación, sobrevivieron el 64,8% a los 86 meses, frente al 100% de supervivencia registrado en los portadores de la mutación en este grupo ($p=0,05$).

También se observó tendencia en el efecto protector de la mutación del codón 175 en los tumores localizados el colon distal ($p=0,09$), en los adenocarcinomas ($p=0,09$) y en aquellos pacientes con tumores que no presentan MSI ($p=0,07$).

Con respecto al análisis del exón 8, se observó que la supervivencia de los pacientes portadores de la mutación era menor en los casos con tumores de colon proximal o tumores de tipo mucinoso. En el colon proximal, se observó una supervivencia del 19,0% con el alelo mutado frente al 60,5% registrado en

ausencia de este alelo ($p=0,01$). Todos los pacientes con tumores mucinosos y mutación del exón 8 fallecieron antes de los 86 meses. Sin embargo, en ausencia de mutación, la supervivencia fue del 45,9% transcurrido este tiempo ($p=0,01$).

También se detectó tendencia hacia un peor pronóstico de la presencia de mutaciones en el exón 8 en los varones ($p=0,09$) y en el grupo de pacientes menores de 71 años ($p=0,06$).

En relación con el codón 282 del exón 8, se observaron diferencias en el pronóstico de los tumores localizados en colon proximal y de los tumores moderadamente diferenciados. La supervivencia de los pacientes con tumores del colon proximal portadores del alelo normal fue del 58,3%, pero no sobrevivió ninguno de los pacientes con el alelo mutado ($p=0,04$). De un modo similar, en los tumores moderadamente diferenciados la supervivencia de los pacientes con el codón 282 mutado fue del 0% y del 56,8% en los que no lo tenían ($p=0,01$).

Cuando se estratificó en función de las mutaciones del codón 289, situado también en el exón 8, se observaron diferencias en el pronóstico de los pacientes varones. Aquellos con el codón mutado presentaron una supervivencia a los 86 meses del 0% y en los que el codón no estaba mutado la supervivencia fue del 60,6% ($p=0,05$).

V.E. Análisis multivariable de la supervivencia global.

Se realizó un análisis multivariable para determinar si el efecto detectado para algunas variables en la supervivencia de los pacientes con CCR, es independiente del resto de los factores pronóstico. En el modelo para la SG se incluyeron el estadio de Dukes y el estado de MSI, además de las mutaciones del codón 175 del exón 5.

Presentaron valor pronóstico independiente el estadio tumoral ($p < 0,001$) y el estado de la MSI ($p = 0,003$). Se calcularon los valores de HR ajustados. Se determinó que en los pacientes con tumores en estadio C, el riesgo de fallecer fue 3,83 veces superior que en estadios precoces (A y B) ($IC_{95\%} = 2,15-6,78$) y en el estadio D aumentó hasta 22,71 veces ($IC_{95\%} = 12,99-37,27$). Además, en los pacientes con tumores MSS y MSI-L, el riesgo de fallecer fue 3,94 veces superior que en los pacientes con MSI-H ($IC_{95\%} = 1,06-10,80$).

Las mutaciones del codón 175 fueron excluidas del modelo. Cuando se ajustó por estadio y el estado de MSI, la presencia de mutaciones en el codón 175 se mostró protectora, con una HR de 0,42 ($IC_{95\%} = 0,10-1,75$) ($p = 0,173$).

Se realizó un análisis multivariable estratificado en función de la localización del tumor. En el análisis se incluyeron el estadio, el estado de la MSI, el grado de diferenciación, las mutaciones del gen p53 globales y las mutaciones del exón 8. En colon proximal solo presentaron valor pronóstico

independiente el estadio tumoral ($p < 0,001$) y el estado de MSI ($p = 0,04$). Para el colon distal ocurrió exactamente lo mismo, solo permanecen en el modelo el estadio tumoral ($p < 0,001$) y el estado de MSI ($p = 0,016$). En el caso del recto también se eliminó el estado de MSI y solo presentó valor pronóstico independiente el estadio tumoral ($p < 0,001$).

VI. EVOLUCIÓN POSTOPERATORIA DE LOS PACIENTES CON CARCINOMA COLORRECTAL ESPORÁDICO. ANÁLISIS DE LA INFLUENCIA PRONÓSTICA: SUPERVIVENCIA LIBRE DE ENFERMEDAD

VI.A. Estudio de la supervivencia libre de enfermedad

La SLE o Intervalo libre de enfermedad (ILE) fue calculada como el tiempo transcurrido entre la fecha de la cirugía y la fecha del diagnóstico de la primera recidiva o, en su defecto, de la última fecha de seguimiento.

Fueron excluidos de este análisis los 58 pacientes sometidos a cirugía paliativa. De nuevo todos los análisis se realizaron en referencia a la mediana del tiempo de seguimiento, que fue 85,9 meses con un rango intercuartílico entre $P_{25}=57,11$ y $P_{75}=107,81$ meses.

En 78 pacientes se diagnosticó recidiva del tumor; en el 20,5% de los casos fue locorregional y en el 79,5% a distancia. La SLE de los pacientes en la mediana del seguimiento fue del 69,4% (Figura 34).

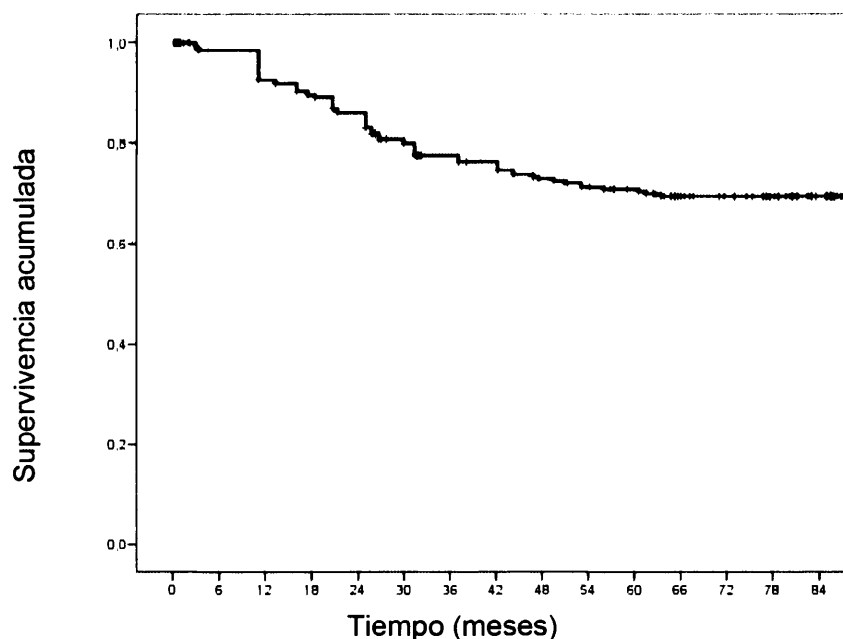


Figura 34. Curva de supervivencia libre de enfermedad acumulada de los pacientes con CCR. Serie de pacientes diagnosticados de CCR en el Hospital Clínico San Carlos de Madrid (Marzo 1995-Abril 2003).

VI.B. Análisis univariable de la probabilidad acumulada de recidivar de los pacientes con CCR, en relación con las variables clinicopatológicas y con los factores pronóstico.

Se realizó un análisis de la SLE en relación con las variables clinicopatológicas y con los factores pronóstico.

En la tabla XVIII se resume el análisis de la SLE en esta cohorte de pacientes en función de las variables estudiadas y la estimación del riesgo

relativo de recidivar (HR), expresado con su correspondiente intervalo de confianza.

No se encontraron diferencias en el pronóstico de los pacientes en función del sexo, los hombres presentaron una SLE en la mediana del tiempo de seguimiento del 68,3% y en las mujeres del 70,5%, un poco superior ($p=0,49$).

En relación a la edad, no se detectaron diferencias significativas en la SLE en los dos subgrupos ($p=0,64$). El riesgo de recidiva de los pacientes mayores de 71 años fue un 11% superior al de los pacientes que no superaban esta edad.

De los factores pronóstico incluidos en el estudio, solo se encontró asociación significativa con la SLE para el estadio de Dukes ($p<0,001$). En el estadio C el riesgo de recidivar fue 3,27 veces superior que en el estadio A o B. La HR para los pacientes con tumores en estadio D en los que se practicó cirugía curativa fue de 7,87 con respecto a los pacientes con estadios A o B (Figura 35).

La localización tumoral no presentó influencia en la SLE. Los tumores localizados en colon proximal presentaron un 3% menos de riesgo de recidiva que los tumores de recto y los localizados en colon distal presentaron un 51% de incremento del riesgo con respecto a este grupo ($p=0,20$).

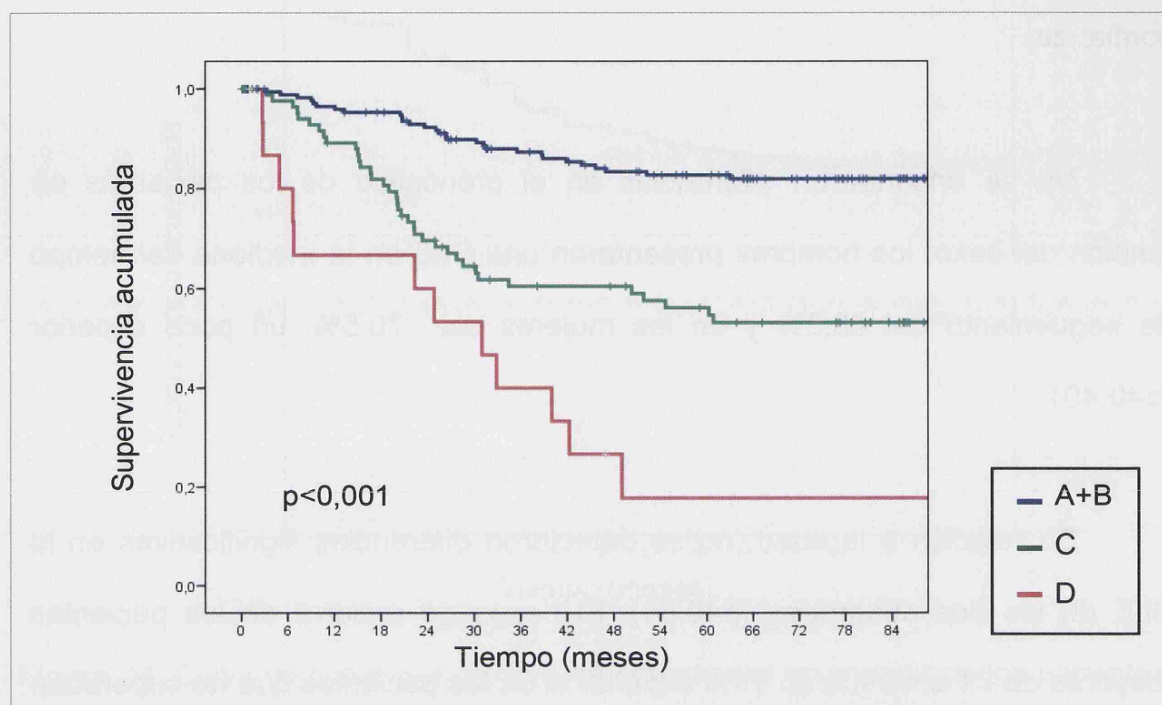


Figura 35. Curva de supervivencia libre de enfermedad acumulada de los pacientes con CCR según el estadio de Duke. Serie de pacientes diagnosticados de CCR en el Hospital Clínico San Carlos de Madrid (Marzo 1995-Abril 2003).

Tampoco se observaron diferencias significativas en la SLE en función del tipo histológico. Los tumores clasificados como adenocarcinomas tenían una HR de 0,56 en relación a los adenocarcinomas mucoides ($p=0,13$).

En relación con el grado de diferenciación, no se detectó influencia en la SLE de los pacientes. En la mediana del tiempo de seguimiento la SLE de los pacientes que presentaban tumores grado I fue del 71,0% y los de grado II del 71,2% ($HR=1,04$), mientras que en aquellos que presentaban tumores grado III fue del 58,3% ($HR=2,41$) ($p=0,25$).

No se observó influencia del estado de MSI en la SLE de los pacientes. Los pacientes con tumores MSI-H presentaron una reducción del 57% en el riesgo de recidivar con respecto a los MSS. El descenso del riesgo en los tumores MSI-L fue del 46% ($p=0,11$).

Tabla XVIII. Análisis univariable de la supervivencia libre de enfermedad en relación con las variables clinicopatológicas y los factores pronóstico en los 286 pacientes con CCR con cirugía curativa. Hospital Clínico San Carlos de Madrid (Marzo 1995-Abril 2003).

Variable	Categorías	SLE (86 m)	HR*	IC 95%	P
Sexo	Hombres	68,3%	1,17	0,75-1,83	0,49
	Mujeres	70,5%			
Edad	≥ 71 años	68,5%	1,11	0,71-1,73	0,64
	< 71 años	70,4%			
Estadio Tumoral	A+B	81,9%	3,27	2,01-5,23	<0,001
	C	53,2%			
	D	17,8%			
Localización del tumor	Colon Proximal	73,7%	0,97	0,54-1,74	0,2
	Colon Distal	60,1%	1,51	0,91-2,51	
	Recto	72,8%			
Tipo Histológico	Adenocarcinoma	70,9%	0,56	0,28-1,13	0,13
	Mucoide	51,3%			
Grado de diferenciación	I	71,0%	1,04	0,56-1,91	0,25
	II	71,2%			
	III	58,3%			
MSI	MSS	66,6%	0,54	0,22-1,34	0,11
	MSI-L	80,8%			
	MSI-H	83,7%	0,43	0,13-1,36	

SLE: supervivencia libre de enfermedad acumulada. HR: hazard ratio. IC95%: intervalo de confianza 95%.

VI.C Análisis univariable de la probabilidad acumulada de recaer de los pacientes con CCR, en relación con la presencia de mutaciones en *p53*

Al igual que en análisis anteriores, la SLE se analizó en función de la mutación total de *p53* y en función de las mutaciones por exones y codones (Tabla XIX).

La mutación del gen *p53* no mostró valor pronóstico en relación con la SLE. En la mediana del seguimiento la SLE de los pacientes con y sin mutación fue similar (65,7% y 72,2%, respectivamente) ($p=0,63$).

El análisis de las mutaciones por exones ofreció resultados similares, no se observó valor pronóstico para ninguno de los exones analizados. Tanto en el exón 5 como en el exón 6 y en el exón 8 la supervivencia fue superior en los tumores sin mutación ($HR=0,73$, $HR=0,58$ y $HR=0,88$ respectivamente). En el exón 7 el riesgo de recidiva fue superior en los tumores sin la mutación ($HR=1,63$) ($p=0,46$).

Del mismo modo, no se observó efecto de las mutaciones divididas por codones en el intervalo libre de enfermedad. En todos los casos, salvo en el codón 289 del exón 8 ($HR=1,05$), la SLE fue mayor en el grupo portador de la mutación. Además, no se observó recidiva en ninguno de los pacientes con

mutaciones en los codones 282 y 288 del exón 8, sin embargo, la frecuencia de mutación fue baja.

Tabla XIX. Análisis univariable de la supervivencia libre de enfermedad en relación con las mutaciones del gen *p53*. Serie de pacientes con CCR diagnosticados en el Hospital Clínico San Carlos de Madrid (Marzo 1995-Abril 2003).

Variable	Categorías	SLE (86 m)	HR*	IC 95%	P
p53 Total	Mutado	65,7%	0,87	0,51-1,50	0,63
	No Mutado	70,2%			
Exones					
Exón 5	Mutado	63,3%	0,73	0,362-1,467	0,4
	No Mutado	71,5%			
Exón 6	Mutado	50,0%	0,58	0,14-2,36	0,48
	No Mutado	69,6%			
Exón 7	Mutado	77,1%	1,63	0,40-6,63	0,46
	No Mutado	68,4%			
Exón 8	Mutado	64,6%	0,88	0,36-2,19	0,79
	No Mutado	69,7%			
Codones					
Codón 175	Mutado	73,3%	0,82	0,30-2,24	0,69
	No Mutado	69,1%			
Codón 248	Mutado	80,0%	0,77	0,11-5,54	0,79
	No Mutado	62,9%			
Codón 282	Mutado	100,0%	0,05	0,00-155,99	0,15
	No Mutado	69,0%			
Codón 288	Mutado	100,0%	0,05	0,00-3108,96	0,27
	No Mutado	69,2%			
Codón 289	Mutado	50,0%	1,05	0,15-7,57	0,96
	No Mutado	69,5%			

SLE: supervivencia libre de enfermedad acumulada. HR: hazard ratio. IC95%: intervalo de confianza 95%. Nivel de significación: $p \leq 0,05$. * Los HR están ajustados por todas las variables de la tabla.

VI.D. Análisis estratificado de la supervivencia libre de enfermedad en función de las mutaciones del gen *p53*.

Se realizó el análisis estratificado de la SLE de los pacientes incluidos en el estudio en función de las variables clinicopatológicas y de la presencia, o no, de mutaciones en el gen *p53*. Este análisis también se realizó primero en el conjunto de mutaciones de *p53* y luego por exones y codones (ver anexo III). En la tabla XX se resumen las variables en las que se detectó valor pronóstico y en aquellas en las que se detectó tendencia hacia una significación pronóstica ($p < 0,1$).

Tabla XX. Resumen del análisis estratificado de la supervivencia libre de enfermedad en función de las mutaciones del gen *p53*. Variables en las que se obtuvo un nivel de significación inferior a 0,1. Serie de pacientes diagnosticados de CCR en el Hospital Clínico San Carlos. (Marzo 1995-Abril 2003).

Variable	Estado	SLE(86 meses)	p
Exón 5			
Hombre	Mutado	100,0%	0,04
	No Mutado	67,7%	
Mujer	Mutado	35,7%	<0,001
	No Mutado	75,1%	
Recto	Mutado	38,9%	0,03
	No Mutado	76,6%	
Moderadamente diferenciado	Mutado	20,0%	0,04
	No Mutado	78,9%	
Codón 175			
Hombre	Mutado	100,0%	0,09
	No Mutado	66,4%	

SLE: supervivencia libre de enfermedad acumulada. Nivel de significación: $p \leq 0,05$.

Tendencia: $p < 0,1$

En el análisis estratificado en relación al exón 5, en varones portadores de la mutación se observó una SLE del 100% frente al 67,7% de los varones no portadores ($p=0,04$). Sin embargo, en las mujeres se observó el efecto contrario, la SLE en la mediana de seguimiento de las portadoras de mutación en el exón 5 fue del 35,7% frente al 75,1% de las no portadoras ($p<0,001$).

En el exón 5 también se observaron diferencias significativas en la SLE de los pacientes con tumores de recto. En los pacientes con tumores de recto que tenían el exón 5 mutado, la SLE en la mediana de seguimiento fue del 38,9% frente al 76,6% de los pacientes sin mutaciones ($p=0,03$) (Figura 36).

También se detectó efecto en la SLE del exón 5 en el análisis estratificado por grado de diferenciación. Los pacientes con tumores moderadamente diferenciados presentaron menor supervivencia si eran portadores de alguna mutación en el exón 5 de *p53*. Los pacientes con mutación tuvieron una SLE del 20,0% frente a un 78,9% en los que no tenían mutación ($p<0,001$).

En el análisis estratificado en relación a las mutaciones del codón 175 del exón 5 solo se detectaron diferencias en la SLE de los varones en esta cohorte. Los hombres portadores de mutación en el codón 175 tenían una SLE del 100% frente a un 66,4% en los hombres sin mutación ($p=0,09$).

VI.E. Análisis multivariable de la supervivencia libre de enfermedad.

Una vez establecidas las variables con valor pronóstico en relación a la SLE, se analizó la importancia relativa de este efecto mediante un análisis multivariable. En el modelo se incluyeron el estadio tumoral, el estado de la MSI y las mutaciones del codón 282 del exón 8.

Las variables incluidas que presentaron valor pronóstico independiente en el riesgo de recaer de los pacientes con CCR fueron el estadio tumoral ($p<0,001$) y el estado de MSI ($p=0,007$). Los valores de riesgo relativo de recaer ajustados para el estadio fueron 3,7 (IC95%=2,25-6,09) en los estadio C y de 10,35 (IC95%=5,16-20,78) en los estadio D en relación a los pacientes con tumores en estadios precoces (A+B). Para la MSI el riesgo ajustado de recaer fue un 73% (IC95%=0,08-0,86) inferior en los pacientes con tumores MSI-H frente a los pacientes con tumores MSI-L y MSS.

Se realizó un análisis multivariable estratificado en función de la localización del tumor. En el análisis se incluyeron el estadio tumoral, el estado de la MSI y las mutaciones del exón 5. En colon proximal solo presentó valor pronóstico independiente el estadio tumoral ($p=0,005$). Para el colon distal ocurrió lo mismo, solo permaneció en el modelo el estadio tumoral ($p=0,002$). En el caso del recto permaneció en el modelo el estadio tumoral ($p<0,001$) además de las mutaciones del exón 5 ($p=0,04$) y por lo tanto ambos presentan

valor pronóstico independiente. El riesgo relativo de recidivar ajustado en los pacientes con cáncer de recto que eran portadores de mutación en el exón 5 fue 3,35 (IC95%=1,23-9,12) veces superior al de los pacientes que no presentaban la mutación.

Capítulo 5: DISCUSIÓN

El cáncer supone la segunda causa de muerte en los países civilizados y el CCR ocupa el segundo lugar en las muertes asociadas a esta causa. Por este motivo se han impulsado numerosos esfuerzos para mejorar el conocimiento de esta enfermedad y prolongar la supervivencia de los pacientes con esta neoplasia.

Existen tres estrategias principales para reducir las muertes asociadas al CCR. Mejorar el diagnóstico temprano de la enfermedad, mejorar la predicción del pronóstico de los pacientes y mejorar los tratamientos disponibles. En este trabajo los esfuerzos se han dirigido a la obtención de herramientas moleculares que puedan ayudar en la predicción de la evolución del paciente. Hasta hace poco, los factores pronóstico disponibles se basaban en parámetros clínicos e histopatológicos que no resultaban suficientemente sensibles y aportaban una información insuficiente. Con frecuencia, pacientes con el mismo estadio histopatológico pueden presentar diferente evolución. Probablemente, esto se deba a las distintas características moleculares de los tumores. La mejora del estudio molecular del tumor puede ayudar a adoptar actitudes terapéuticas cada vez más individualizadas y eficaces.

Para poder analizar la influencia pronóstica de parámetros moleculares, es importante partir de una población con unos criterios de inclusión estrictos y así minimizar las variaciones en la evolución provocadas por otros factores distintos al que se desea estudiar. Por este motivo, en este estudio se han incluido pacientes manejados bajo un único criterio clínico, ya que el manejo

quirúrgico del paciente puede tener gran influencia en el pronóstico de los pacientes¹⁶⁶. Por el mismo motivo, solo se incluyeron los tumores esporádicos que cumplieron los criterios de inclusión estrictamente, para estar seguros de no incluir en el estudio tumores con otros componentes clínicos o moleculares que afecten al pronóstico.

Al tratarse de un estudio pronóstico, se han incluido todos los datos con influencia clínica relevante. Además, se han recopilado datos del seguimiento de los pacientes durante un largo periodo de tiempo, para poder evaluar de forma correcta los efectos en el pronóstico.

En la actualidad, se sabe que la aparición del cáncer se debe a la acumulación de alteraciones genéticas que confieren a las células tumorales la capacidad de eludir los mecanismos celulares de control de la proliferación. La presencia de unas u otras alteraciones genéticas pueden dotar a la célula tumoral de características determinadas, que hacen que el tumor tenga un comportamiento más o menos agresivo.

De acuerdo con el modelo enunciado por Volgestein et al., existe una serie de alteraciones genéticas que con elevada frecuencia se asocian a determinados cambios morfológicos del proceso tumoral⁶⁵. Sin embargo, la mayoría de los tumores presentan inestabilidad genómica, y las alteraciones presentes en la célula tumoral son mucho más numerosas que las establecidas en este modelo¹⁶⁷.

La alteración del gen *p53* ha sido detectada en el 50% de los cánceres y se considera el evento genético más frecuente en el cáncer humano. La frecuencia de mutación de *p53* puede llegar hasta el 70%, aunque varía mucho en función de las publicaciones y del tipo de cáncer estudiado¹³⁴. Es muy probable que la elevada frecuencia de mutación detectada en *p53* y su asociación a tantos tipos de tumores, estén causados por la diversidad de procesos en los que está implicado. Su alteración afecta a la proliferación celular, la apoptosis, la senescencia y la vascularización, que son procesos muy relacionados con la progresión tumoral. La apoptosis juega un importante papel en la tumorigénesis, solo aquellas células capaces de esquivar los mecanismos que activan la apoptosis en presencia de mutaciones, serán capaces de continuar dividiéndose. Por este motivo tienen especial relevancia las mutaciones de *p53* que conducen a una inactivación de la función proapoptótica^{168,169}

A diferencia de otros genes, la aparición de mutaciones en el gen *p53*, en muchos casos, además de afectar a la actividad de la proteína, afecta a su estabilidad, provocando la aparición de formas de la proteína que se acumulan en la célula neoplásica. Esta característica promovió mucho el estudio de *p53* mediante técnicas de inmunohistoquímica antes de la mejora de las técnicas de biología molecular, y contribuyó a aumentar el número de publicaciones relacionadas con la proteína. Sin embargo, no todas las mutaciones provocan

la acumulación de *p53* y la acumulación de la proteína no corresponde en todos los casos a la presencia de proteína mutada^{162,168}.

A pesar de la amplia literatura disponible sobre *p53*, el principal motivo que promovió el desarrollo de este trabajo fue la falta de consenso en relación con el efecto de las alteraciones de *p53* en el pronóstico de los pacientes con CCR esporádico^{170,171}. Además, la posibilidad de trabajar en una población amplia, homogénea y con un largo seguimiento, incentivó la idea de obtener datos que aportaran información válida adicional a las publicaciones existentes.

El estudio se realizó empleando una técnica de cribado de las mutaciones. Como el objetivo de este estudio fue obtener información con utilidad clínica, que pudiera ser aplicada al manejo de los pacientes de nuestro centro, se seleccionó un método fácil de incluir en la rutina del laboratorio por ser más económico en tiempo y en dinero que otros disponibles. Además, esta técnica ya había demostrado una elevada sensibilidad en la detección de mutaciones en el gen *p53*^{172,173}.

Las frecuencias de mutación de *p53* detectadas por otros autores en CCR varían entre el 9,3% y el 68% en publicaciones con más de 40 pacientes realizadas en países desarrollados. La mayoría presentan frecuencias entre el 35 y el 50%¹⁷⁴. La frecuencia de mutación encontrada en este trabajo fue del 19,9%, que se encuentra cerca del límite inferior de este rango. Otros grupos han presentado porcentajes similares. En un estudio realizado en una población de 72 pacientes de Luxemburgo, la frecuencia de mutación

detectada fue del 18,1% y se argumentaba que esta frecuencia se debía a diferencias en los factores ambientales a los que estaban sometidas las poblaciones. Estos autores asociaron frecuencias de mutación superiores con los estudios realizados en población norteamericana¹⁷⁵.

En algunos casos, la frecuencia de mutación publicada por otros autores es más elevada debido a la selección de una población con pérdida alélica del brazo corto del cromosoma 17 para la detección de alteraciones en *p53*. Se ha descrito que en estos casos la frecuencia de mutación del gen está incrementada¹⁶³.

La variabilidad en las frecuencias de mutación encontradas puede deberse diferentes factores como: el empleo de diferentes técnicas para la detección (SSCP, electroforesis en gradiente de gel desnaturizante, electroforesis en gel de gradiente, secuenciación directa), al uso de muestras sometidas a diferentes métodos de conservación (congeladas o parafinadas) o a la heterogeneidad en la composición celular de los tumores, ya que las poblaciones portadoras de la mutación pueden ser escasas, especialmente en los estadios A y B¹⁷⁶. Esta variabilidad también puede estar influida por las diferentes características de las poblaciones estudiadas, bien por diferencias en los criterios de reclutamiento de pacientes, bien por las diferencias en la exposición a algunos factores de riesgo¹⁷⁷⁻¹⁷⁹.

La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) ha recopilado en una base de datos la información publicada en relación a las mutaciones del gen *p53*. De las más de 24.810 mutaciones somáticas registradas, el 97% se concentran en el dominio de unión al ADN (exones 5-8), de las cuales más del 75% son mutaciones de cambio de aminoácido^{174,180}. Este dominio es en el que se ha centrado este estudio.

El patrón de mutaciones detectadas es específico para cada tipo de tumor¹⁸¹. Las mutaciones se encuentran con elevada frecuencia en determinados puntos de la secuencia, mientras que otras se han descrito como un proceso muy infrecuente¹⁸². La frecuencia con que se encuentran mutadas cada una de las localizaciones varía en función del tipo tumoral. Se han descrito puntos calientes de mutación para CCR que aparecen mutados con una frecuencia superior al del resto de codones de la proteína: 175, 245, 248, 273 y 282^{171,183}. La mutación detectada con mayor frecuencia en nuestra cohorte es la localizada en el codón 175, seguida de la mutación del codón 248. Estas alteraciones también han sido descritas como las más frecuentes en la literatura y además se ha demostrado que dan lugar a proteínas inactivas¹⁸²

184

Sin embargo, en nuestra cohorte ninguno de los pacientes presentó mutación el codón 273, que está incluido dentro de los cinco puntos calientes de mutación para el CCR¹⁸³. La variabilidad en el espectro de mutaciones encontradas con mayor frecuencia es muy amplia. Algunos autores presentan

como puntos frecuentes un conjunto de mutaciones que pueden no coincidir con el listado consenso presentado anteriormente¹⁸⁵.

Esta gran variabilidad también hace que el exón con mayor frecuencia de mutación varíe mucho en función de los autores. En nuestra cohorte, el exón 5, que contiene el codón 175, es el que se encuentra mutado con mayor frecuencia, seguido del exón 8. La literatura previa no coincide con estos resultados en las frecuencias de mutación por exones; sin embargo, los resultados previos tampoco coinciden entre autores^{176,185}. Bazan et al. analizan los mismos cuatro exones que en nuestro trabajo, sin embargo, opuestamente a nuestros resultados, las mutaciones en su población se encuentran mayoritariamente en los exones 6 y 7, que son los menos representados en nuestra población. También cambia en esta población el tipo de mutaciones, en nuestra población se detectaron microinserciones y microdeleciones en menos del 2% de los casos y en este grupo representan el 23% de las alteraciones detectadas¹⁷⁶. Además, en muchos trabajos, no se realiza división en función de la localización de la alteración en el análisis de las mutaciones.

La mayoría de los autores coinciden en relación al tipo de alteración que es detectada con mayor frecuencia en el gen *p53*. La mayoría de las mutaciones detectadas en este trabajo y por otros autores son variaciones de una sola base, de tipo transición y que provocan el cambio de un aminoácido^{176,184,186}.

En cuanto a la relación de las mutaciones del gen *p53* en conjunto con las variables clinicopatológicas incluidas en el estudio, no se observó asociación significativa con ninguna de ellas. Otros autores tampoco encontraron relación significativa con ninguna de las variables clinicopatológicas^{187,188}.

Sin embargo, en nuestra cohorte de pacientes, las mutaciones localizadas en el codón 175 presentan una relación significativa con los tumores de colon distal, y en el caso del codón 288 se asocian con recto. Algunos autores también detectaron diferencias significativas en la frecuencia de mutación de *p53* en función de la localización. Samowitz et al. detectaron mayor frecuencia de mutación en tumores distales, pero en esta población no se incluyeron tumores de recto¹⁸⁶. El grupo de Børresen-Dale afirmó que los tumores que presentan una mayor frecuencia de alteraciones son los localizados en recto¹⁸⁹. Russo et al. establecieron que la frecuencia en tumores distales y de recto era muy similar, y que las diferencias se detectaban con el colon proximal¹⁶⁴. Sin embargo, estos autores en un trabajo posterior mostraron resultados no tan contundentes en cuanto a la asociación de *p53* con la localización. En la población analizada por estos autores, los tumores de recto presentaron mayor frecuencia de mutación de *p53*, seguidos de los tumores de colon distal y de los de colon proximal, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas¹⁹⁰. De este modo, la mayoría de los autores coinciden en que, como ocurrió en nuestra cohorte, a pesar de que los resultados no sean estadísticamente significativos, los tumores localizados en

colon proximal presentan menor frecuencia de mutación de *p53* que los tumores en otras localizaciones.

En el análisis detallado del exón 6 se ha encontrado una relación estadísticamente significativa con el grado de diferenciación tumoral. La frecuencia de mutación disminuyó con la diferenciación del tumor. Ninguno de los estudios encontrados mostró asociación de las mutaciones de *p53* con el grado de diferenciación. Probablemente, otros autores no lo detectaron debido a que en muchos casos el análisis de las mutaciones no se realizó por exones y el grado de diferenciación se analizó de forma agrupada. Algunos autores reflejaron una mayor frecuencia de mutación en los tumores pobremente diferenciados, pero la variación en la frecuencia con la diferenciación no ha sido publicada con anterioridad¹⁹¹.

Diversos autores encontraron mayor frecuencia de mutación en estadios tumorales más avanzados o incluso en estadios concretos (estadio II o estadio III)^{164,186,192}. En nuestra cohorte, la frecuencia de mutación fue muy similar en todos los estadios salvo en estadio A, en el que la frecuencia disminuye sin ser estadísticamente significativa la diferencia. Esta tendencia fue observada del mismo modo por Kahlenbreg et al. en CCR esporádico¹⁸⁵. Algunos autores asociaron la presencia de mutaciones de *p53* en estadios avanzados con la presencia de factores de predisposición como la elevada ingesta de carne o alcohol¹⁷⁷.

Westra et al. detectaron asociación de la presencia de mutaciones de *p53* con el tipo histológico. Este grupo detectó mayor frecuencia de mutación en tumores no mucinosos en una población de pacientes con tumores en estadio III¹⁹¹. De acuerdo con estos autores, en nuestra cohorte la frecuencia de mutación en adenocarcinomas no mucinosos fue el doble que la detectada en los no mucinosos pero, a pesar de esto, las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

Tradicionalmente, en el modelo de tumorigénesis colorrectal desarrollado por Fearon y Volgestein, el gen *p53* se asoció a la vía de la CIN⁶⁵. Sin embargo, Curtis et al. demostraron que podía no existir asociación entre este gen y el fenotipo CIN¹⁹³. Posteriormente, otros autores afirmaron que la alteración de *p53* por sí sola no era suficiente para provocar la aparición de alteraciones cromosómicas en tumores CCR¹⁹⁴. Debido a la frecuencia de mutación de *p53* detectada por numerosos autores y a la implicación de *p53* en un elevado número de procesos, es probable que las alteraciones de este gen puedan no ser exclusivas de una sola vía de tumorigénesis.

En nuestra cohorte la frecuencia de mutación detectada en tumores con MSI-H fue del 13,6%. Otros autores encontraron frecuencias similares de mutación en este grupo de tumores^{195,196}. Esta frecuencia es inferior a la detectada en tumores con MSI-L o MSS pero las diferencias no resultaron estadísticamente significativas. Estos datos están de acuerdo con los encontrados por Westra et al. Estos autores afirmaron que la presencia de

mutaciones de *p53* es más frecuente en CIN que en MSI, aunque no encontraron diferencias significativas¹⁹¹. Otros autores han encontrado frecuencias similares en los tumores MSS y en los MSI-L, cercanas al 20%, como en nuestro caso. Este grupo no detectó mutaciones en los tumores con MSI-H pero esto puede deberse a que trabajaban con una población pequeña (35 pacientes)¹⁹⁷. A pesar de que los estudios en los que se analiza la relación de *p53* y MSI son escasos, la mayoría de los autores coinciden en encontrar una frecuencia de mutación significativamente inferior en los tumores MSI-H^{186,189,198-201}.

A pesar de que no se ha detectado asociación negativa significativa de las mutaciones de *p53* con MSI-H, llama la atención que ambas características se localicen de forma inversa. En este trabajo se ha demostrado que la frecuencia de mutación de *p53* es inferior en tumores localizados en colon proximal. Previamente, había sido demostrada en esta cohorte la localización preferencial de los tumores MSI-H en tumores de colon proximal²⁰².

En nuestra cohorte, al analizar en conjunto las mutaciones del gen *p53*, no se encontró ninguna relación con el pronóstico de los pacientes con CCR esporádico. Numerosos estudios tampoco encontraron valor pronóstico de *p53* en este tipo de tumores^{187,188,20,204}. Sin embargo, existe un número importante de autores que encontraron relación entre la presencia de mutaciones en *p53* y un peor pronóstico en pacientes con CCR^{163,186,192,205,206}.

Hay grupos que además han encontrado que el efecto de estas mutaciones en la evolución de los pacientes es independiente del efecto de otros factores pronóstico^{185,191,207}.

No todos los estudios recogen los datos necesarios para la evaluación del efecto de las mutaciones de p53 en la SLE. En este trabajo se demostró el incremento del riesgo de recidiva asociado a la presencia de mutaciones en el exón 5 en tumores de recto, en tumores moderadamente diferenciados y en mujeres. En el análisis multivariable además se demostró que las mutaciones del exón 5 presentan valor pronóstico independiente en la SLE de tumores de recto. Varios autores detectaron el efecto negativo de las mutaciones de p53 en la SLE, pero ninguno de ellos realizó el análisis en función de la localización de la mutación y solo Westra et al. demostraron valor pronóstico independiente^{176,182}. El único estudio que demostró la relación del exón 5 con peor pronóstico no incluyó análisis de la SLE¹⁶⁴. Otros autores habían demostrado previamente que en tumores de recto algunos factores moleculares tiene un efecto distinto en el pronóstico que en los tumores detectados en otras localizaciones²⁰⁸.

Algunos autores detectaron asociación con peor pronóstico excluyendo los pacientes con MSI de su población, por considerar que presentan un pronóstico distinto, además de una baja frecuencia de mutación de p53¹⁸⁴. Esto explicaría a la vez, las diferencias en el valor pronóstico y en la frecuencia de mutación de nuestra cohorte en relación con este tipo de estudios.

Otros autores limitan el efecto negativo de *p53* en el pronóstico a estadios tempranos o a tumores localizados en colon distal^{189,192,209}. Contradictoriamente, en nuestra población se observa una tendencia hacia una mayor supervivencia en los tumores distales en presencia de mutaciones de *p53*. Este efecto había sido descrito previamente por Soong et al.²¹⁰. Otros autores detectaron el efecto negativo de las mutaciones de *p53*, del exón 8 y del codón 282 en la SG de los pacientes con tumores proximales¹⁹⁰. También había sido descrito previamente por otros autores pero solo para las mutaciones localizadas en el exón 5, que son las detectadas con mayor frecuencia en nuestra cohorte¹⁶⁴.

Al igual que en este estudio, algunos autores tampoco detectaron efecto negativo de las mutaciones del gen *p53* de forma global en el pronóstico de los pacientes, pero sí en el análisis por tipos de mutaciones^{164,189}. En nuestra cohorte se ha detectado el efecto negativo de las mutaciones del exón 8 de *p53* en la SG de los pacientes con tumores de colon proximal o tumores de tipo mucinoso. Soong et al. detectaron una tendencia hacia un peor pronóstico en los pacientes portadores de mutación en el exón 8²¹¹. El efecto de las alteraciones de este exón también fueron asociadas a los tumores distales por Russo et al. En concreto, este grupo detectó efecto negativo en el pronóstico de las mutaciones detectadas en el dominio LSH, que son las siglas inglesas de Lazo-Lámina-Hélice, que comprende los codones del 271 al 286 y está localizado en el exón 8¹⁶⁴.

También se detectó en nuestra cohorte un efecto negativo en el pronóstico de las mutaciones del codón 282, situado en el exón 8. Este efecto se ha observado en tumores de colon proximal y en tumores moderadamente diferenciados. El efecto negativo de las mutaciones en este punto concreto fue también descrito por Soong et al. para la población general²¹¹. Además, el grupo de Samowitz et al. encontraron asociación de la presencia de alteraciones en el codón 282, de forma aislada, y del grupo de mutaciones que denominaron desnaturalizantes (175/245/282), con una menor supervivencia a los 5 años de seguimiento¹⁸⁶.

Se cree que la relación entre la mutación de *p53* y el peor pronóstico se debe en parte al aumento de la neovascularización por la alteración de la proteína *p53* (disminución de la expresión de inhibidores de la angiogénesis y activación de factores de crecimiento vascular y el factor básico de crecimiento de fibroblastos). Este hecho favorecería el crecimiento y especialmente la diseminación tumoral^{212,213}. Otros autores argumentan que podría deberse a diferencias en la respuesta al tratamiento adyuvante administrado a los pacientes con CCR²¹⁴.

En cambio, otros autores hablaron de un efecto protector de la presencia de mutaciones en el gen *p53*, aunque la mayoría de estos estudios se centran en algunos subgrupos de pacientes. Se detectó mejor pronóstico asociado a *p53* en tumores en estadio B y en tumores distales en estadios B y C²¹⁰. Esta

asociación ha sido más frecuentemente descrita para la sobreexpresión o acumulación de la proteína *p53*^{215,216}. En un estudio realizado por este grupo de trabajo con anterioridad y en muestras previas de CCR esporádico, se demostró que la presencia de acumulación de la proteína *p53* era factor pronóstico independiente para la SLE. En relación a la SG, los resultados no demostraron una relación significativa con el pronóstico, pero se observó una mayor supervivencia en el grupo con sobreexpresión de la proteína²¹⁷.

En nuestra cohorte se observó que la presencia de mutación en determinados puntos del gen *p53* confiere un mejor pronóstico en tumores con determinadas características. Presentan una mayor supervivencia los pacientes portadores de mutaciones en *p53* con tumores localizados en colon distal. Estos datos coinciden exactamente con los resultados obtenidos por el Soong et al. y que no han vuelto a ser demostrados por ningún otro grupo²¹⁰.

Además de las mutaciones globales, tanto las mutaciones del exón 5, como las del codón 175, presentaron efecto protector en la SG también en tumores distales. En el caso del codón 175 también se observó tendencia hacia este efecto protector en adenocarcinomas no mucinosos y en tumores que no se desarrollaron por la vía de la MSI. Contradictoriamente, varios autores habían mostrado que las mutaciones en este codón tienen un fenotipo agresivo y lo relacionaron con un peor pronóstico^{218,219}. Sin embargo, otros autores no detectaron relación de la presencia de mutaciones en el codón 175 con el pronóstico de los pacientes¹⁸⁹. Una vez más, nuestros resultados coinciden

parcialmente con los presentados por Soong et al., quienes detectaron una relación débil entre las mutaciones del codón 175 y una mejor supervivencia²¹⁰.

El efecto protector ha sido también observado en otros tipos de tumores como los gliomas de bajo grado y el cáncer de pulmón de células no pequeñas^{220,221}. Por el momento, no se han conseguido descifrar los mecanismos implicados en el efecto protector de las mutaciones de *p53*. Se ha establecido la hipótesis de que si la presencia de alteraciones en *p53* lleva, en muchos casos, a la acumulación de mutaciones en la célula, el mecanismo protector podría ser similar al del fenotipo mutador, asociado a MSI, y también vinculado a un mejor pronóstico²¹⁰.

En muchos casos no se puede hablar del efecto pronóstico de las mutaciones de *p53* en global. Se ha demostrado en líneas celulares de colon que diferentes formas mutadas de *p53* presentan diferentes propiedades biológicas^{180,222,223}. Nuestros resultados apoyan esta afirmación, existen mutaciones que presentan un efecto protector y sin embargo otras incrementan el riesgo de morir o recaer. No obstante, los datos obtenidos deben ser interpretados con cautela debido al reducido número de casos resultantes cuando se crean los subgrupos. Los diferentes papeles que juega *p53* en el pronóstico de los pacientes con CCR podrían deberse a la presencia de mecanismos alternativos de interrupción de la vía de transducción de señales de *p53*. Se ha descrito que las alteraciones de MDM2 o *p73* juegan un papel en el control de la apoptosis^{224,168}.

Existe una extensa literatura relacionada con el valor pronóstico de *p53* y en muchos casos los trabajos no llegan a las mismas conclusiones. Es importante determinar concretamente el efecto de las mutaciones del gen *p53* en la evolución de los pacientes. Esto hace que las referencias relacionadas con *p53* y su valor pronóstico sigan apareciendo continuamente en la literatura²²⁵.

A pesar de la reducción del número de casos, al realizar la división por mutaciones y por subgrupos de pacientes, se ha conseguido demostrar que las mutaciones del exón 5 son un factor pronóstico independiente en la predicción del riesgo de recidiva en cáncer de recto. Aunque estos resultados son muy llamativos, deberían ser confirmados en un subgrupo mayor de pacientes con este tipo de tumores.

Para poder aplicar algunos de los resultados obtenidos en beneficio de los pacientes sería necesario confirmarlos en una cohorte de pacientes mayor. La baja frecuencia de las mutaciones concretas hace que sea difícil realizar estudios con un tamaño poblacional suficiente, que nos permita demostrar o refutar el papel de las mutaciones de *p53* como factor pronóstico. En algunos casos se ha recurrido a trabajos multicéntricos. Sin embargo, en estos casos resulta muy difícil que el manejo de los pacientes y la detección de las alteraciones se hagan en unas condiciones y bajo unos criterios homogéneos.

Capítulo 6: CONCLUSIONES

1. La frecuencia de mutación del gen *p53* en los exones 5-8 en nuestra cohorte de pacientes con CCR esporádico fue de 19,9%. Las mutaciones se localizaron con mayor frecuencia en el exón 5 y el exón 8. Las mutaciones puntuales que aparecieron con mayor frecuencia se localizaron en los codones 175, 248, 282 288 y 289.
2. Las mutaciones en el codón 175 son más frecuentes en tumores localizados en colon distal, y las del exón 288 en los tumores de recto.
3. No se observó relación significativa de ninguna de las mutaciones de *p53* con el estado de la MSI; sin embargo el 88,2% de las mutaciones se detectaron en tumores MSS.
4. Los tumores con mutaciones en el codón 175 presentaron una reducción del 73% en el riesgo de fallecer.
5. La presencia de mutaciones en *p53* fue un factor de peor pronóstico en la SG de los pacientes de colon proximal.
6. Las mutaciones de *p53* en el exón 5 y en el codón 175, presentaron efecto protector en la SG de los pacientes con tumores de colon distal. La presencia de mutaciones en el codón 175 fue factor protector en los varones, los pacientes menores de 71 años, los pacientes con adenocarcinomas mucoides y en los pacientes con tumores MSS.

7. La presencia de mutaciones en el exón 8 supuso un incremento del riesgo de fallecer en tumores de colon proximal y en tumores mucinosos. Las mutaciones del codón 282 fueron un factor de peor pronóstico en la SG de los pacientes con tumores de colon proximal o con tumores moderadamente diferenciados.
8. La presencia de mutaciones en el exón 5 de p53 incrementó el riesgo de recaer en pacientes con tumores de recto, en pacientes con tumores moderadamente diferenciados y en mujeres. Sin embargo presentó un efecto reductor del riesgo en el grupo de los varones.
9. En los tumores de recto presentaron valor pronóstico independiente en la SLE el estadio tumoral y la presencia de mutaciones en el exón 5 de p53.

BIBLIOGRAFÍA

1. World Health Organisation. Global Action against cancer. Disponible en URL:http://cancer.iaea.org/documents/WHO_Global_Action_Cancer_Engl_2005.pdf
2. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Globocan 2008: Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10 Lyon, France.2010.
3. Asociación Española contra el cáncer. El cáncer en España. Disponible en URL:<http://www.todocancer.com/ESP/Informacion+Cancer/Estadistica/cifras+de+cancer+en+españa/Cifras+de+cancer+en+España.htm>
4. López-Abente G, Pollán M, Aragonés N, Pérez-Gómez B. Informe sobre la salud de los españoles. Cáncer. Area de Epidemiología Ambiental y Cáncer. Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de Salud Carlos III.2003.
5. Skibber JM, Minsky BD, Hoff PM. Cancer of the colon. Capitulo 33.7 En: Cancer Principles and Practice of Oncology. De Vita VT, Hellman S, Rosenberg SA (eds). 6th edition Lippincott Williams and Wilkins. 2001.
6. <http://www.todocancer.com/NR/rdonlyres/3BF40B87-AEA0-4256-9ED2-07C13B654ADB/0/mortalidad.pdf>
7. Martin L, Assem M, Piard F. Are there several types of colorectal carcinomas? Correlations with genetic data. Eur J Cancer Prev 1999; 8: S13-20
8. Sadler TW. Embriología del Aparato Digestivo. En: Langman, Embriología Médica. 5º edición. Ciudad de Méjico:panamaricana; 1986; 239-48.

9. Zabalegui N, Zárata R, Catalán V, Honorato B, García F, Bandrés E, Hernández JL, García-Foncillas J. Susceptibilidad genética en cáncer de colon. Rev Med Univ Navarra 2003; 47: 20-3.
10. Alonso A, Moreno S, Valiente A, Artigas M, Perez-Juana A, Ramos-Arroyo MA. Mecanismos genéticos en la predisposición hereditaria al cáncer colorrectal. Aa. Sist. Sanit. Navar. 2006; 29: 59-76.
11. Allen BA, Terdiman JP. Hereditary polyposis syndromes and hereditary non-polyposis colorectal cancer. Best Pract Res Clin Gastroenterol 2003; 2: 237-58.
12. Cruz-Bustillo D. Molecular genetics of colorectal cancer. Rev Esp Enferm Dig 2004; 96: 48-59.
13. Clavijo SA. Cáncer de Colon y recto. Disponible en URL: http://www.elportaldelasalud.com/index.php?option=com_content&task=view&id=94&Itemid=158
14. Sociedad Española de Patología Digestiva. Disponible en: <http://www.sepd.org/formacion/pepticum/4-068.htm>
15. Fearnhead NS, Britton MP, Bodmer WF. The ABC of APC. Hum Mol Genet 2001; 7: 721-33.
16. Lynch JP, Hoops TC. The genetic pathogenesis of colorectal cancer. Hematol Oncol Clin N Am 2002; 16: 775-810.
17. Howe JR, Roth S, Ringold JC, Summers RW, Jarvinen HJ, Sistonen P, et al. Mutations in the SMAD4/DPC4 gene in juvenile polyposis. Science 1998; 280: 1086-88.

18. Giardiello FM, Brensiger JD, Tersmette AC, Goodman SN, Petersen GM, Booker SV, et al. Very high risk of cancer in familial Peutz-Jeghers syndrome. *Gastroenterology* 2000; 119: 1447-53.
19. Hemminki A, Markie D, Tomlinson I, Avizienyte E, Roth S, Loukola A, et al. A serine/threonine kinase gene defective in Peutz-Jeghers syndrome. *Nature* 1998; 391: 184-7.
20. Vasen HF, Mecklin Jp, Meera Khan P, Lynch HT. The international collaborative group on hereditary nonpolyposis colorectal cancer (ICG-HNPCC). *Dis Colon Rectum* 1991; 34: 424-5.
21. Vasen HF, Watson P, Mecklin JP, Lynch HT. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. *Gastroenterology* 1999; 116: 1453-6.
22. Chung DC, Rustgi AK. The Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer syndrome: Genetics and clinical implications. *Ann Intern Med* 2003; 138: 560-70.
23. Burkitt DP. Epidemiology of cancer of the colon and rectum. *Cancer* 1971; 28: 3-13.
24. Miller AB, Berrino F, Hill M, Pietinen P, Riboli E, Wahrendorf I. Diet in the aetiology of cancer: a review. *Eur J Cancer* 1994; 30: 207-20.
25. Franceschi S, Favero A, La Vecchia C, Negri E, Conti E, Montella M, et al. Food groups and risk of colorectal cancer in Italy. *Int J Cancer* 1997; 72: 56-61.

26. Bingham SA, Day NE, Luben R, Ferrari P, Slimani N, Norat T, et al. Dietary fibre in food and protection against colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): an observational study. *Lancet* 2003; 361: 1496-501.
27. Fuchs CS, Giovannucci EL, Colditz GA, Hunter DJ, Stampfer MJ, Rosner B, et al. Dietary Fiber and the risk of colorectal cancer and adenoma in women. *N Engl J Med* 1999; 340: 169-76.
28. Casimiro C. Factores etiopatogénicos en el cáncer colorrectal. Aspectos nutricionales y de estilo de vida (segunda parte de dos). *Nutr. Hosp.* 2002; XVII: 128-38.
29. Scheppach W, Bartram HP, Richter F. Role of short-chain fatty acids in the prevention of the colorectal cancer. *Eur J Cancer* 1995; 31: 1077-80.
30. Nagengast FM, Grubben MJAL, Van Munster IP. Role of bile acids in colorectal carcinogenesis. *Eur J Cancer* 1995; 31: 1067-70.
31. Mc Keown-Eyssen GE, Bright-See E, Bruce WR, Jazmaji V, the Toronto Polyp Prevention Group. A randomised trial of a low fat, high fibre diet in the recurrence of colorectal polyps. *J Clin Epidemiol.* 1994; 5: 525-36.
32. MacLennan R, Macrae F, Bain C, Battistutta D, Chapuis P, Gratten H et al. Randomized trial of intake of fat, fiber and b-carotene to prevent colorectal adenomas. *J Natl Cancer Inst.* 1995; 87: 1760-6.
33. Alberts DS, Martínez ME, Roe DJ, Guillén-Rodríguez JM, Marshall JR, Van Leeuwen JB, et al. Lack of effect of a high-fiber cereal supplement on the recurrence of colorectal adenomas. *N Engl J Med* 2000; 342:1156-62.

34. Schatzkin A, Lanza E, Corle D, Lance P, Iber F, Caan B, et al. Lack of effect of a low fat, high fiber diet on the recurrence of colorectal adenomas. *New Engl J Med*. 2000; 16: 1149-55.
35. Willett WC. Goals for nutrition in the year 2000. *CA Cancer J Clin* 1999; 49: 331-52.
36. Schloss I, Kidd MS, Tichelaar HY; et al Dietary factors associated with a low risk of colon cancer in coloured west coast fishermen. *S Afr Med J*. 1997; 87: 152-8
37. Forones NM, Falcao JB, Mattos D, Barone B. Cholesterolemia in colorectal cancer. *Hepatogastroenterology* 1998; 45: 1531-4.
38. Scheppach W, Bingham S, Bourtron-Ruault MC, Gerhardsson de Verdier M, Moreno V, Nagengast FM, et al. WHO Consensus statement on the role of nutrition in colorectal cancer. *Eur J Cancer Prev* 1999; 8: 57-62.
39. Sandhu MS, White IR, McPherson K, Systematic review of prospective cohort studies on meat consumption and colorectal cancer risk: a meta-analytical approach. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2001; 10:439-46.
40. Forman D. Meat and cancer: a relation in search of a mechanism. *The Lancet* 1999; 353: 686-7.
41. Janne PA, Mayer RJ. Chemoprevention of colorectal cancer. *New Engl J Med*. 2000; 26: 1960-8.
42. Slattery ML, Anders K, Curtin K, Ma KN, Schaffer D, Samowitz W. Dietary intake and microsatellite instability in colon tumors. *Int J Cancer* 2001; 93: 601-7.

43. Giovannucci E. An updated review of the epidemiological evidence that cigarette smoking increases the risk of colorectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2001; 10: 725-31.
44. Breuer-Katchinski B, Nemes K, Marr A, Rump B, Leiendecker B, Breuer N et al. Alcohol and cigarette smoking and the risk of colorectal adenomas. *Dig Dis Sci.* 2000; 45: 487-93.
45. Giovannucci E, Egan KM, Hunter DJ, Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC, et al. Aspirin and the risk of colorectal cancer in women. *N Engl J Med* 1995; 333: 609-14.
46. García-Rodríguez LA, Huerta-Alvarez C. Reduced risk of colorectal cancer among long-term users of aspirin and nonaspirin nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Epidemiology* 2001; 88-93.
47. Casimiro C. Factores etiopatogénicos en el cáncer colorrectal. Aspectos geneéticos y clínicos (primera parte de dos). *Nutr Hosp* 2002; 17: 63-71.
48. Fernández E, La Vecchia C, Balducci A, Chatenoud L, Franceschi S, Negri E. Oral contraceptives and colorectal cancer risk: a meta-analysis. *Br J Cancer* 2001; 84: 722-7.
49. Grodstein F, Newcomb PA, Stampfer MJ. Postmenopausal hormone therapy and the risk of colorectal cancer: a review and meta-analysis. *Am J Med* 1999; 106: 574-82.
50. Garcia R. Enfermedad Inflamatoria intestinal. Disponible en URL. <http://www.fisterra.com/guias2/eii.asp>

51. Ekblom A, Helmick C, Zack M, Adami HO. Increased risk of large-bowel cancer in Crohn's disease with colonic involvement. *Lancet* 1990; 336: 357-9.
52. Kodner IJ, Fry RD, Fleshman JN, Birnbaum EH, Read TE. Capítulo 26: Colon, recto y ano. En: *Principios de cirugía*. 7ª Edición. Mc-Graw-Hill Interamericana editores. 2000.
53. Mayer RJ. Capítulo 257: Tumores de intestino delgado y grueso. En: *Principios de Medicina Interna*. 13ª edición. Harrison. 1996.
54. Arminski TC, McLean DW: Incidence and distribution of adenomatous polyps of the colon and rectum based on 1000 autopsy examinations. *Dis Colon Rectum* 1964; 7: 249-61.
55. Hamilton SR, Volgestein B, Kudo S, et al. Carcinoma of the colon and rectum. In: Hamilton SR, Aaltonen LA eds. *World Health Organisation Classification of tumours: Pathology and Genetics. Tumours of the digestive system*. Lyon: IARC Press; 2000: 103-43.
56. Vachani C. Understanding your Pathology Report: Colon Cancer. Disponible en <http://www.oncolink.org/types/article.cfm?c=5&s=11&ss=605&id=9584> URL:
57. Secco GB, Fardelli R, Campora E, et al. Primary mucinous adenocarcinomas and signet-ring cell carcinomas of colon and rectum. *Oncology* 1994; 51: 30-4.
58. Nissan A, Guillem JG, Paty PB, et al. Signet-ring cell carcinoma of the colon and rectum: a matched control study. *Dis Colon Rectum* 1999; 42: 1176-80.

59. Jackman RJ, Mayo CW. The adenoma-carcinoma sequence in cancer of the colon. *Surg Gynecol Obstet*, 1951; 93: 327-30.
60. O'Brien MJ, O'Keane JC, Zauber A, Gottlieb LS, Winawer SJ. Precursors of colorectal carcinoma. Biopsy and biologic markers. *Cancer* 1992; 70: 1317-27.
61. Muto T, Bussey HJ, Morson BC. The evolution of cancer of the colon and rectum. *Cancer* 1975; 36: 2251-70.
62. Winawer SJ, Zauber AJ, Ho MN, O'Brien MJ, Gottlieb LS, Sternberg SS et al. Prevention of colorectal cancer by colonoscopic polypectomy. *N Engl J Med* 1993; 329: 1977-81.
63. Hill MJ, Morson BC, Bussey HJR. Aetiology of adenoma-carcinoma sequence in large bowel. *Lancet* 1978; 1: 245-8.
64. Vogelstein B, Fearon E, Hamilton S, Kern S, Preisinger A, Leppert M, et al. Genetic alterations during colorectal tumor development. *N Engl J Med* 1988; 319: 525-32.
65. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 661: 759-67.
66. Shibata D, Peinado MA, Ionov Y, Malkhosyan S, Perucho M. Genomic instability in repeated sequences is an early somatic event in colorectal tumorigenesis than persists after transformation. *Nature Genetics* 1994; 6: 273-81.
67. Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S et al. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* 1993; 363: 558-61.

68. Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 1993; 260: 816-9.
69. Aaltonen LA, Peltomaki P, Leach FS et al. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science* 1993; 260: 812-6.
70. Lipton L, Halford SE, Johnson V, Novelli MR, Jones A, Cummings et al. Carcinogenesis in *MYH*-Associated Polyposis follows a distinct genetic pathway. *Cancer Res* 2003; 63: 7595-9.
71. Fodde R, Kuipers J, Rosenberg C, Smits R, Kielman M, Gaspar C et al. Mutations in the APC tumor suppressor gene cause chromosome instability. *Nat Cell Biol* 2001; 3: 433-8.
72. Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 1996; 87: 159-70.
73. Peltomaki P, Aaltonen L, Sistonen P, Pylkkanen L, Mecklin JP, Jarvinen H, et al. Genetic mapping of a locus predisposing to human colorectal cancer. *Science* 1993; 260: 810-2.
74. Weber JL y Wong C. Mutation of human short tandem repeats. *Hum Mol Genet* 1993; 2: 123-8.
75. Mao L, Lee DJ, Tockman MS, Erozan YS, Askin F y Sidransky D. Microsatellite alterations as clonal markers in the detection of human cancer. *Proc Natl Acad Sci* 1994; 91: 9871-5.
76. Boland C, Thibodeau S, Hamilton S, Sidransky D, Eshleman J, Burt R, et al. A National Cancer Institute workshop on microsatellite instability for cancer detection and familial predisposition: Development of International Criteria

- for the Determination of Microsatellite Instability in Colorectal Cancer. *Cancer Res* 1998; 58: 5248-57.
77. Liu W, Dong X, Mai M, Seeklan RS, Tnguchi K, Krishnadath KK et al. Mutations in *AXIN2* cause colorectal cancer with defective mismatch repair by activation β -catenin/TCF signalling. *Nat Genet* 2000; 26: 146-7.
78. Sahshidharan M, Smyrk T, Kin KM, Ternent CA, Thorson AG, Blatchford GJ et al. Histologic comparison of hereditary nonpolyposis colorectal cancers associated with MSH 2 and MLH1 and colorectal cancer from the general population. *Dis Colon Rectum* 1999; 42: 722-6.
79. Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, Herman JG, Baylin SB, Issa JP. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 8681-6.
80. Al-Tassan N, Chmiel NH, Maynard J et al. Inherited variants of MYH associated with somatic G:C→T:A mutations in colo-rectal tumors. *Nat Genet* 2002; 30: 227-32.
81. Sieber OM, Lipton L, Crabtree M, Heinemann K, Fidalgo P, Philips RK, et al. Multiple colorectal adenomas, classic adenomatous polyposis, and germline mutations in *MYH*. *N Engl J Med* 2003; 348: 791-9.
82. Slupphaug G, Kavli B, Krokan HE. The interacting pathways for the prevention and repair of oxidative DNA damage. *Mutat Res* 2003; 531:231: 231-51.
83. Lefevre JH, Rodriguez CM, Mourra N, Bennis M, Flejou JF, Parc N et al. Implication of MYH in colorectal Polyposis. *Annals of Surgery* 2006; 244: 874-80.

84. Green RA, Kaplan KB. Chromosome Instability in colorectal tumor cells is associated with defects in microtubule plus-end attachments caused by a dominant mutation in APC. *J Cell Biol* 2003; 163: 949-61.
85. Sparks AB, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW. Mutational analysis of the APC/b-catenin/Tcf pathway in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998; 58: 1130-4.
86. Powell SM, Zilz N, Beazer-Barclay Y, Bryan TM, Hamilton SR, Thibodeau SN, Vogelstein B, Kinzler KW. APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature*, 1992; 359: 235-7.
87. Groden J, Thliveris A, Samowitz W, Carlson M, Gelbert L, Albertsen H et al. Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli. *Cell* 1991; 66: 589-600.
88. Nishisho I, Nakamura Y, Miyoshi Y, Miki Y, Ando H, Horii A et al. Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients. *Science* 1991; 253: 665-9.
89. Bérout C, Soussi T. APC gene: database of germline and somatic mutations in human tumor and cell lines. *Nucleic Acids Res* 1996; 24: 121-4.
90. Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B, et al. Activation of β -catenin-Tcf signalling in colon cancer by mutations in β -catenin or APC. *Science* 1997; 275: 1787-90.
91. Fearon ER, Cho KR, Nigro JM, Kern SE, Simons JW, Ruppert JM, et al. Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. *Science* 1990; 247: 49-56.

92. Thierry-Mieg D, Thierry-Mieg J "AceView: a comprehensive cDNA-supported gene and transcripts annotation" *Genome Biol.* 2006; 7:S12.1-14.
93. Edelman GM. Morphoregulatory molecules. *Biochemistry* 1988; 27: 3533-43.
94. Keino-Masu K, Masu M, Hinck L, Leonardo ED, Chan SS, Culotti JG, y cols. Deleted in Colorectal Cancer (DCC) encodes a netrin receptor. *Cell.* 1996; 87: 175-85.
95. Mehlen P, Bredesen DE. The dependence receptor hypothesis. *Apoptosis* 2004; 9: 37-49.
96. Carvalho AL, Chuang A, Jiang WW, Lee J, Begum S, Poeta L et al. Deleted in colorectal cancer is a putative conditional tumor-suppressor gene inactivated by promoter hypermethylation in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 2006; 66: 9401-7.
97. Takayama T, Miyanishi K, Hayashi T, Sato Y, Niitsu Y. Colorectal cancer: genetics of development and metastasis. *J Gastroenterol.* 2000; 41 :185-92.
98. Barbacid M. Ras genes. *Annu. Rev. Biochem* 1987; 56: 779-827.
99. Der CJ, Krontiris TG, Cooper GM. Transforming genes of human bladder and lung carcinoma cell lines are homologous to the ras genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1982; 79: 3637-40.
100. Chang EH, Gonda MA, Ellis RW, Scolnick EM, Lowy DR. Human genome contains four genes homologous to transforming genes of Harvey and Kirsten murine sarcoma viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1982; 79: 4848-52.

101. Takai Y, Sasaki T, Matozaki T. Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev* 2001; 81: 153-208.
102. Burmer GC, Loeb LA. Mutations in the KRAS2 oncogene during progressive stages of human colon carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989; 86: 2403-7.
103. Almoguera C, Shibata D, Forrester K, Martin J, Arnheim N, Perucho M. Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. *Cell.* 1988; 53: 549-54.
104. Tam IY, Chung LP, Suen WS, Wang E, Wong MC, Ho KK et al. Distinct epidermal growth factor receptor and KRAS mutation patterns in non-small cell lung cancer patients with different tobacco exposure and clinicopathologic features. *Clin Cancer Res.* 2006; 12: 1647-53.
105. Kim IJ, Park JH, Kang HC, Shin Y, Park HW, Park HR et al. Mutational analysis of BRAF and K-ras in gastric cancers: absence of BRAF mutations in gastric cancers. *Hum Genet.* 2003; 114: 118-20.
106. Marsischky GT, Filosi N, Kane MF, Kolodner R. Redundancy of *Saccharomyces cerevisiae* MSH3 and MSH6 in MSH2-dependent mismatch repair. *Genes dev.* 1996; 10: 407-20.
107. Lipkin SM, Wang V, Jacoby R, Banerjee-Basu S, Baxevanis AD, Lynch HT, Elliot RM, Collins FS. MLH3: a DNA mismatch repair gene associated with mammalian microsatellite instability. *Nature genet.* 2000; 24: 27-35.
108. Leung WK, Kim JJ, Wu L, Sepulveda JL, Sepulveda A. Identification of a second MutL DNA mismatch repair complex (hMLH1 and hPMS1) in human epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 2000; 275: 15728-32.

109. Kane MF, Loda M, Gaida GM, Lipman J, Mishra R, Goldman H, Jessup JM, Kolodner R. Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch defective human tumor cell lines. *Cancer Res.* 1997; 57: 808-11.
110. Herman JG, Umar A, Polyak K, Graff JR, Ahuja N, Issa JPJ, Markowitz S et al. Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proc. Natl. Acad.* 1998; 95: 6870-5.
111. Cunningham JM, Kim CY, Christensen ER, Tester DJ, Parc Y, Burgart LJ, Halign KC, Mc Donnell SK, Schaid DJ, Wish VC, Kubly V, Nelson H, Michels VV, Thibodeau SN. The frequency of hereditary defective mismatch repair in a prospective series of unselected colorectal cancer carcinomas. 2001; 69: 780-90.
112. Linzer DI and Levine AJ. Characterization of a 54 KDa cellular SV40 tumor antigen present in SV40 transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* 1979;17:43-52
113. Baker SJ, Markowitz S, Fearon ER, Willson JK and Vogelstein B. Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53. *Science* 1990; 249:912-5
114. Levine A.J. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 1997; 88: 593-602.
115. Hollstein M, Rice K, Greenblatt MS, Soussi T, Fuchs R, Sorlie T et al. Database of p53 gene somatic mutation in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Res* 1994; 22: 3551-5.

- 116. Ko LJ and Prives C. p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev* 1996; 10: 1054-72.
- 117. Guidos CJ, Williams CJ, Grandal J, Knowles G, Huang MT and Danska JS. V(D)J recombination activates a p53 dependent DNA damage checkpoint in scid lymphocyte precursors. *Genes Dev* 1996; 10: 2038-54.
- 118. Woods DB, Vousden KH. Regulation of p53 function. *Experimental Cell Research* 2001; 264: 56-66.
- 119. Ryan KM, Philipps AC, Vousden KH. Regulation and function of the p53 tumor supresor protein. *Curr Opin Cell Biol* 2001; 13: 332-7.
- 120. Kubbutat MHG, Jones SN, Vousden KH. Regulation of p53 by stability by Mdm2. *Nature* 1997; 387: 299-303.
- 121. Gottlieb TM, Oren M. p53 in growth control and neoplasia. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1287: 77-102.
- 122. Wagner AJ, Kokontis JM, Hay N. Myc-mediated apoptosis requires wild-type p53 in a manner independent of cell cycle arrest and the ability of p53 to induce p21 Aaf1/Cip1. *Genes Dev* 1994; 8:2817-30.
- 123. Yonish-Ruach E, Resnitsky D, Lotem J, Sachs I, Kinchi A, Oren M. Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature* 1991; 352: 345-7.
- 124. Johnson P, Chung S, Benchimosl S. Growth suppression of Friend virus-transformed erythroleukemia cells by p53 protein in accompanied by hemoglobin production and sensitive to erythropoietin. *Mol Cell Biol* 1993; 13: 1456-63.

125. Maheswaran S, Englert C, Bennet P, Heinrich G, Haber DA. The WT1 gene product stabilizes p53 and inhibits p53-mediated apoptosis. *Gene Dev* 1995; 9: 2143-56.
126. Ryan KM, Philipps AC, Vousden KH. Regulation and function of the p53 tumor supresor protein. *Curr Opin Cell Biol* 2001; 13: 332-7.
127. Brady HJ, Gil-Gómez G. Molecules in focus Bax. The pro-apoptotic Bcl-2 family member, Bax. *Int J Biochem Cell Biol* 1998; 30: 647-50.
128. Fukasawa k, Choi T, Kuriyama R, Rulong S, Vande Woude GF. Abnormal centrosome amplificatio in the absence of p53 . *Science* 1996; 271:1744-7.
129. Volpert OV, StellmAch V, Bouck N. The modulation of trombospondin and other naturally occurring inhibitors of angiogenesis during tumor progression. 1995; 36:119-26.
130. Dameron KM, Volpert OV, Tainsky MA, Bouck N. Control of angiogenesis in fibroblast by p53 regulation of trambospondin-1. *Science* 1994; 265:1582-4.
131. Reiher F, Ozer O, Pins M, Jovanovic BD, Eggener S, Campbell SC. p53 and microvessel density in primary resection specimens of superficial bladder cancer. *J Urol* 2002; 167: 1469-74.
132. Walker KK, Levina AJ. Identification of a novel p53 functional domain that is necessary for efficient growth suppression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 15335-40.
133. Hollstein M, Sidransky D, Volgestein B, Harris C. p53 mutations in human cancers. *Science* 1991; 253: 49-53.
134. Soussi T. The p53 tumor suppressor gene: from molecular biology to clinical investigation. *Ann N Y Acad Sci*. 2000; 910: 121-37.

135. Ashcroft M, Kubbutat MHG, Vousden KH. Regulation of p53 function and stability by phosphorylation. *Mol Cell Biol.* 1999; 3: 1751-8.
136. Van Ojen MG and Slootweg PJ. Gain-of-function mutations in the tumor supressor gene p53. *Clin Cancer Res.* 2000; 6: 2138-45.
137. Smith ML, Fornace AJ. Genomic instability and the role of p53 mutations in cancer cells. *Curr Opin Oncol* 1995; 7: 69-75.
138. Griffin MP, Bergstralt EJ, Coffey RJ, Beart RW Jr, Melton LJ III. Predictor of survival after curative resection of carcinoma of the colon and rectum. *Vancer* 1987; 60: 2318-24.
139. Freedman LS, Macaskill P, Smith AN. Multivariate analysis of prognostic factors for operable recatal cancer. *Lancet* 1984; 2: 733-6.
140. Lockarth-mummery JP. Two hundred cases of cancer of the rectum treated by perineal excision. *Br J Surj.* 1927; 14: 110-24.
141. Dukes CE. The classification of cancer of the rectum. *J Pathol* 1932; 35: 323-32.
142. Turnbull RB Jr, Kyle K, Watson FR, Spratt J. Cancer of the colon: influence of the notouch isolation technique on survival rate. *Ann Surg* 1967; 166: 420-7
143. Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Totti A, editors. *AJCC cancer satging manual*. 7th ed New York, NY. Springer; 2009.
144. Fujita S, Shimoda T, Yoshimura K, Yamamoto S, Akasu T, Moriya Y. Prospective evaluation of prognostic factors in patients with colorectal cancer undergoing curative resection. *J Surg Oncol* 2003; 84: 127-31.

125. Maheswaran S, Englert C, Bennet P, Heinrich G, Haber DA. The WT1 gene product stabilizes p53 and inhibits p53-mediated apoptosis. *Gene Dev* 1995; 9: 2143-56.
126. Ryan KM, Philipps AC, Vousden KH. Regulation and function of the p53 tumor supresor protein. *Curr Opin Cell Biol* 2001; 13: 332-7.
127. Brady HJ, Gil-Gómez G. Molecules in focus Bax. The pro-apoptotic Bcl-2 family member, Bax. *Int J Biochem Cell Biol* 1998; 30: 647-50.
128. Fukasawa k, Choi T, Kuriyama R, Rulong S, Vande Woude GF. Abnormal centrosome amplificatio in the absence of p53 . *Science* 1996; 271:1744-7.
129. Volpert OV, StellmAch V, Bouck N. The modulation of trombospondin and other naturally occurring inhibitors of angiogenesis during tumor progression. 1995; 36:119-26.
130. Dameron KM, Volpert OV, Tainsky MA, Bouck N. Control of angiogenesis in fibroblast by p53 regulation of trambospondin-1. *Science* 1994; 265:1582-4.
131. Reiher F, Ozer O, Pins M, Jovanovic BD, Eggener S, Campbell SC. p53 and microvessel density in primary resection specimens of superficial bladder cancer. *J Urol* 2002; 167: 1469-74.
132. Walker KK, Levina AJ. Identification of a novel p53 functional domain that is necessary for efficient growth suppression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 15335-40.
133. Hollstein M, Sidransky D, Volgestein B, Harris C. p53 mutations in human cancers. *Science* 1991; 253: 49-53.
134. Soussi T. The p53 tumor suppressor gene: from molecular biology to clinical investigation. *Ann N Y Acad Sci*. 2000; 910: 121-37.

135. Ashcroft M, Kubbutat MHG, Vousden KH. Regulation of p53 function and stability by phosphorylation. *Mol Cell Biol.* 1999; 3: 1751-8.
136. Van Ojen MG and Slootweg PJ. Gain-of-function mutations in the tumor supressor gene p53. *Clin Cancer Res.* 2000; 6: 2138-45.
137. Smith ML, Fornace AJ. Genomic instability and the role of p53 mutations in cancer cells. *Curr Opin Oncol* 1995; 7: 69-75.
138. Griffin MP, Bergstralt EJ, Coffey RJ, Beart RW Jr, Melton LJ III. Predictor of survival after curative resection of carcinoma of the colon and rectum. *Vancer* 1987; 60: 2318-24.
139. Freedman LS, Macaskill P, Smith AN. Multivariate analysis of prognostic factors for operable recatal cancer. *Lancet* 1984; 2: 733-6.
140. Lockarth-mummery JP. Two hundred cases of cancer of the rectum treated by perineal excision. *Br J Surj.* 1927; 14: 110-24.
141. Dukes CE. The classification of cancer of the rectum. *J Pathol* 1932; 35: 323-32.
142. Turnbull RB Jr, Kyle K, Watson FR, Spratt J. Cancer of the colon: influence of the notouch isolation technique on survival rate. *Ann Surg* 1967; 166: 420-7
143. Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Totti A, editors. *AJCC cancer satging manual*. 7th ed New York, NY. Springer; 2009.
144. Fujita S, Shimoda T, Yoshimura K, Yamamoto S, Akasu T, Moriya Y. Prospective evaluation of prognostic factors in patients with colorectal cancer undergoing curative resection. *J Surg Oncol* 2003; 84: 127-31.

145. Nan KJ, Quin HX, Yang G. Prognostic factors in 165 elderly colorectal cancer patients. *World J Gastroenterol*. 2003; 9: 2207-10.
146. Green JB, Timmcke AE, Mitchell WT, et al. Mucinous carcinoma just another cancer. *Dis Colon Rectum* 1993; 36: 49-54.
147. Parramore JB, Wei JP, Yeh KA. Colorectal cancer in patients under forty: presentation and outcome. *Am Surg* 1998; 64: 563-8.
148. Grinnell RS. The grading and prognosis of carcinoma of the colon and rectum. *Cancer* 1950; 3:641-52.
149. Compton CC. Optimal pathologic staging for colon cancer: Defining Stage II Disease. *Clin Cancer Res* 2007; 22: 6862s-70s.
150. Eche N, Pichon MF, Quillen V, Gory-Delabaere G, Riedinger JM, Basuyau JP, et al. Standards, options and recommendations for tumor markers in colorectal cancer. *Bull Cancer* 2001; 88: 1177-206.
151. Compton CC, Fielding LP, Burgart LJ, Conley B, Cooper HS, Hamilton SR et al. Prognostic factors in colorectal cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med* 2000; 124:979-94.
152. Compton C, Fenoglio-Preiser CM, Pettigrew N, Fielding LP. American Joint Committee on cancer prognostic factors consensus conference. Colorectal working group. *Cancer* 2000; 88: 1739-57.
153. Bast RC, Ravdin P, Hayes DF, Bates S, Fritsche H. 2000 update of recommendations for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer: Clinical Practice Guidelines of the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol* 2001; 6: 1865-78.

154. Duffy MJ, Van Dalen A, Haglund C, Hansson L, Klapdor R, Lamerz R et al. Clinical utility of biochemical markers in colorectal cancer: European Group on Tumour Markers (EGTM) guidelines. *Eur J Cancer* 2003; 39: 718-27.
155. Greenson JK, Bonner JD, Ben-Yzhak O, Cohen HI, Miselevich I, Resnick MB, Trougouboff P, Tomsho LD, Kim E, Low M, Rennert G, Gruber SB. Phenotype of Microsatellite Unstable Colorectal Carcinomas: Well-differentiated and focally mucinous tumors and the absence of dirty necrosis correlate with microsatellite instability. *Am J Surg Pathol.* 2003; 27: 563-70.
156. Washington MK, Berlin J, Branton PA, Burgart LJ, Carter DK, Fitzgibbons PL, et al. Protocol for the examination of specimens from patients with primary carcinomas of the colon and rectum. *Arch Pathol Lab Med.* 2008; 132, 1182-93.
157. Corman J, Arnoux R, Peloquin A, et al. Blood transfusions and survival after colectomy for colorectal cancer. *Can J Surg* 1986; 29: 325-9.
158. Eisenberg B, Decosse JJ, Harford F, Michalck J. Carcinoma of the colon and rectum: the natural history reviewed in 1704 patients. *Cancer* 1982; 49: 1131-4.
159. Steinberg SM, Barkin JS, Kaplan RS, Stablein DM. Prognostic indicators of colon tumors. The Gastrointestinal Tumor Study Group experience. *Cancer* 1986; 57: 1866-70.
160. Quesada-Chanto, A. Diagnóstico de Laboratorio. Principales pruebas de bioquímica clínica y hematología. 1° ed. Litografía e Imprenta Lehmann. San José Costa Rica, 2003.

161. Filella X, Molina R, Grau JJ et al Prognostic value of CA 19.9 levels in colorectal cancer. *Ann Surg* 1992; 216: 55-9.
162. Petersen S, Thames HD, Nieder C, Petersen C, Baumann M. The results of colorectal cancer treatment by p53 status: treatment-specific overview. *Dis Colon Rectum* 2001; 44: 322-33.
163. Hamelin R, Laurent-Puig P, Olschwang S, Jego N, Asselain B, Remvikos Y, et al. Association of p53 mutations with short survival in colorectal cancer. *Gastroenterology* 1994; 106: 42-48.
164. Russo A, Bazan V, Iacopetta B, Kerr D, Soussi T, Gebbia, N. The TP53 Colorectal Cancer International Collaborative Study on the prognostic and Preictive Significance of p53 Mutation: Influence of Tumor Site, Type of Mutation and Adjuvant treatment. *J Clin Oncol.* 2005; 23: 7518-28
165. Nasierowska-Guttmejer A, Trzeciak L, Nowacki M, Ostrowski J. P53 Protein accumulation and p53 mutation in colorectal cancer. *Pathology Onc Res.* 2000; 6: 275-9.
166. Cerdán FJ, Díez M, Martínez, Moreno G, Torres J, Balibrea JL. Resultados tras resección radical ampliada por carcinoma colorrectal localmente avanzado. *Rev Esp Enf Digest.* 1994; 85: 435-39.
167. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 1998; 396: 643-9.
168. Nyiraneza C, Jouret-Mourin A, Kartheuser A, Camby P, Plomteux O, Detry R, et al. Distinctive patterns of p53 protein expression and microsatellite instability in human colorectal cancer. *Hum Pathol.* 2011 (Pendiente de publicación en papel).

-
169. Suzuki K, Matsubara H. Recent Advances in p53 Research and Cancer Treatment. *J Biomed Biotechnol*. 2011 (Pendiente de publicación en papel).
170. Locker GY, Hamilton S, Harris J, Jessup JM, Kemeny N, Macdonald JS, et al. ASCO 2006 update of recommendations for the use of tumor markers in gastrointestinal cancer. *J Clin Oncol*. 2006; 24: 5313-27.
171. Duffy MJ, van Dalen A, Haglund C, Hansson L, Holinski-Feder E, Klapdor R, et al. Tumour markers in colorectal cancer: European Group on Tumour Markers (EGTM) guidelines for clinical use. *Eur J Cancer*. 2007; 43: 1348-60.
172. O'Connell CD, Atha DH, Oldenburg MC, Tian J, Siebert M, Handrow R, et al. Detection of p53 gene mutations: analysis by single-strand conformation polymorphism and cleavage fragment length polymorphism. *Electrophoresis* 1999; 20: 1211-23.
173. Curtin K, Slattery ML, Holubkov R, Edwards S, Holden JA, Samowitz WS. p53 alterations in colon tumors: a comparison of SSCP/sequencing and immunohistochemistry. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2004; 12: 380-6.
174. Petitjean A, Mathe E, Kato S, Ishioka C, Tavtigian SV, Hainaut P, Olivier M. Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Hum Mutat*. 2007; 28: 622-9.
175. Pauly M, Schmitz M, Kayser I, Türeci O, Lagoda P, Seitz G, Dicato M. Ki-ras oncogene and p53 tumour suppressor gene mutations in colorectal carcinomas from the European Saar-Luxembourg region are less frequent

- than predicted by the classic adenoma-carcinoma sequence model. *Eur J Cancer* 1997; 33: 2265-72.
176. Bazan V, Agnese V, Corsale S, Calò V, Valerio MR, Latteri MA, et al; Gruppo Oncologico dell'Italia Meridionale (GOIM). Specific TP53 and/or Ki-ras mutations as independent predictors of clinical outcome in sporadic colorectal adenocarcinomas: results of a 5-year Gruppo Oncologico dell'Italia Meridionale (GOIM) prospective study. *Ann Oncol.* 2005; 16: iv50-55.
177. Park JY, Mitrou PN, Keen J, Dahm CC, Gay LJ, Luben RN, et al. Lifestyle factors and p53 mutation patterns in colorectal cancer patients in the EPIC-Norfolk study. *Mutagenesis* 2010; 25: 351-8.
178. Slattery ML, Curtin K, Ma K, Edwards S, Schaffer D, Anderson K, Samowitz W. Diet activity, and lifestyle associations with p53 mutations in colon tumors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2002; 11: 541-8.
179. Huang CC, Cheng YW, Chen MC, Lin YS, Chou MC, Lee H. Different p53 mutation patterns in colorectal tumors from smokers and nonsmokers. *Environ Mol Mutagen.* 2006; 47: 527-32.
180. Kato S, Han SY, Liu W, Otsuka K, Shibata H, Kanamaru R, Ishioka C. Understanding the function-structure and function-mutation relationships of p53 tumor suppressor protein by high-resolution missense mutation analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 8424-9.
181. Soussi T. The p53 tumor suppressor gene: a model for molecular epidemiology of human cancer. *Mol Med Today* 1996; 2:32-37.

182. Soussi T, Kato S, Lavy PP, Ishioka C. Reassessment of the TP3 mutation Database in human Disease by Data Mining with a Library of TP53 Missense Mutations. *Hum Mutat* 2005; 25: 6-17.
183. Bérout C, Soussi T. The UMD-p53 database: new mutations and analysis tools. *Hum Mutat*. 2003; 21: 176-81.
184. Tortola S, Marcuello E, González I, Reyes G, Arribas R, Aiza G et al. p53 and K-ras gene mutations correlate with tumor aggressiveness but are not of routine prognostic value in colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 1999; 17: 1375-81.
185. Kahlenberg MS, Stoler DL, Rodriguez-Bigas MA, Weber TK, Driscoll DL, Anderson GR, Petrelli NJ. p53 tumor suppressor gene mutations predict decreased survival of patients with sporadic colorectal carcinoma. *Cancer*. 2000; 88: 1814-9.
186. Samowitz WS, Curtin K, Ma K, Edwards S, Schaffer D, Leppert MF, Slattery ML. Prognostic significance of p53 mutations in colon cancer at the population level. *Int J Cancer* 2002; 99: 597-602.
187. Bosari S, Viale G, Roncalli M, Graziani D, Borsani G, Lee AKC, Coggi G. p53 gene mutations, p53 protein accumulation and compartmentalization in colorectal adenocarcinoma. *Am J Pathol* 1995; 147: 790–8.
188. Morrin M, Kelly M, Barrett N, Delaney P. Mutations of Ki-ras and p53 genes in colorectal cancer and their prognostic significance. *Gut* 1994; 35: 1627–31.

189. Børresen-Dale AL, Lothe RA, Meling GI, Hainaut P, Rognum TO, Skovlund E. TP53 and long-term prognosis in colorectal cancer: mutations in the L3 zinc-binding domain predict poor survival. *Clin Cancer Res.* 1998; 4: 203-10.
190. Iacopetta B, Russo A, Bazan V, Dardanoni G, Gebbia N, Soussi T et al. TP53-CRC Collaborative Group. Functional categories of TP53 mutation in colorectal cancer: results of an International Collaborative Study. *Ann Oncol.* 2006; 17: 842-7.
191. Westra JL, Schaapveld M, Hollema H, de Boer JP, Kraak MM, de Jong D et al. Determination of TP53 mutation is more relevant than microsatellite instability status for the prediction of disease-free survival in adjuvant-treated stage III colon cancer patients. *J Clin Oncol.* 2005; 23: 5635-43.
192. Goh HS, Elnatan J, Low CH, Smith DR. p53 point mutation and survival in colorectal cancer patients: effect of disease dissemination and tumour location. *Int J Oncol* 1999; 15: 491-8.
193. Curtis LJ, Georgiades IB, White S, Bird CC, Harrison DJ, Wyllie AH. Specific patterns of chromosomal abnormalities are associated with RER status in sporadic colorectal cancer. *J Pathol.* 2000; 192: 440-5.
194. Bunz F, Fauth C, Speicher MR, Dutriaux A, Sedivy JM, Kinzler KW et al. Targeted inactivation of p53 in human cells does not result in aneuploidy. *Cancer Res.* 2002; 62: 1129-33.
195. Bond CE, Umapathy A, Ramsnes I, Greco SA, Zhen Zhao Z, Mallitt KA, et al. p53 mutation is common in microsatellite stable, BRAF mutant colorectal cancers. *Int J Cancer.* 2011 (Pendiente de publicación en papel).

-
196. Iacopetta B. TP53 mutation in colorectal cancer. *Hum Mutat.* 2003; 21: 271-6.
197. Li D, Semba S, Wu M, Yokozaki H. Molecular pathological subclassification of mucinous adenocarcinoma of the colorectum. *Pathol Int.* 2005; 55: 766-74.
198. Cottu PH, Muzeau F, Estreicher A, Flejou JF, Iggo R, Thomas G, Hamelin R. Inverse correlation between RER+ status and p53 mutation in colorectal cancer cell lines. *Oncogene* 1996; 13: 2727-30.
199. Kim H, Jen J, Volgestein B, Hamilton SR. Clinical and Pathological characteristics of sporadic colorectal carcinomas con DNA replication errors in microsatellite sequences. *Am J Pathol* 1994; 145: 148-56.
200. Elsaleh H, Powell B, McCaul K, Grieu F, Grant R, Joseph D, Iacopetta B. P53 alteration and microsatellite instability have predictive value for survival benefit from chemotherapy in stage III colorectal carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2001;7:1343-9.
201. Mahdavinia M, Bishehsari F, Verginelli F, Cumashi A, Lattanzio R, Sotoudeh M, et al. P53 mutations in colorectal cancer from northern Iran: Relationships with site of tumor origin, microsatellite instability and K-ras mutations. *J Cell Physiol.* 2008; 216: 543-50.
202. Maestro ML, Vidaurreta M, Sanz-Casla MT, Rafael S, Veganzones S, Martínez A et al. Role of the BRAF mutations in the microsatellite instability genetic pathway in sporadic colorectal cancer. *Ann Surg Oncol.* 2007; 14: 1229-36.

203. Slebos RJC, Baas IO, Clement M, Polak M, Mulder J-W, van den Berg FM, et al. Clinical and pathological associations with p53 tumour-suppressor gene mutations and expression of p21WAF1/Cip1 in colorectal carcinoma. *Br J Cancer* 1996; 74: 165–71.
204. Servomaa K, Kiuru A, Kosma VM, Hirvikoski P, Rytömaa T. p53 and K-ras gene mutations in carcinoma of the rectum among Finnish women. *Mol Pathol* 2000; 53: 24-30.
205. Kressner U, Inganas M, Byding S, Blikstad I, Pahlman L, Glimelius B, Lindmark G. Prognostic value of p53 genetic changes in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 1999; 17: 593–9.
206. Yu SJ, Yu JK, Ge WT, Hu HG, Yuan Y, Zheng S. SPARCL1, Shp2, MSH2, E-cadherin, p53, ADCY-2 and MAPK are prognosis-related in colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2011; 17: 2028-36.
207. Hardingham JE, Butler WJ, Roder D, Dobrovic A, Dymock RB, Sage RE, Roberts-Thomson IC. Somatic mutations, acetylator status, and prognosis in colorectal cancer. *Gut* 1998; 42: 669–72.
208. Samowitz WS, Curtin K, Wolff RK, Tripp SR, Caan BJ, Slattery ML. Microsatellite instability and survival in rectal cancer. *Cancer Causes Control*. 2009; 20: 1763-8
209. Leahy DT, Salman R, Mulcahy H, Sheahan K, O'Donoghue D, Parfrey NA. Prognostic significance of p53 abnormalities in colorectal carcinoma detected by PCR-SSCP and immunohistochemical analysis. *J Pathol*. 1996; 180: 364–70.

210. Soong R, Grieu F, Robbins P, Dix B, Chen D, Parsons R, House A, Iacopetta B. p53 alterations are associated with improved prognosis in distal colonic carcinomas. *Clin Cancer Res.* 1997; 3: 1405-11.
211. Soong R, Powell B, Elsaleh H, Gnanasampanthan G, Smith DR, Goh HS et al. Prognostic significance of TP53 gene mutation in 995 cases of colorectal carcinoma. Influence of tumour site, stage, adjuvant chemotherapy and type of mutation. *Eur J Cancer.* 2000; 36: 2053-60.
212. Grant SW, Kyshtoobayeva AS, Kurosaki T, Jakowatz J, Fruehauf JP. Mutant p53 correlates with reduced expression of thrombospondin-1, increased angiogenesis, and metastatic progression in melanoma. *Cancer Detect Prev.* 1998; 22:185-94.
213. Takahashi Y, Bucana CD, Cleary KR, Ellis LM. p53, vessel count, and vascular endothelial growth factor expression in human colon cancer. *Int J Cancer.* 1998; 79: 34-8.
214. Tominaga T, Iwahashi M, Takifuji K, Hotta T, Yokoyama S, Matsuda K, et al. Combination of p53 codon 72 polymorphism and inactive p53 mutation predicts chemosensitivity to 5-fluorouracil in colorectal cancer. *Int J Cancer.* 2010; 126: 1691-701.
215. Ahnen DJ, Feigl P, Quan G, Fenoglio-Preiser C, Lovato LC, Bunn PA, et al. Ki-ras mutation and p53 overexpression predict the clinical behaviour of colorectal cancer: a Southwest Oncology Group study. *Cancer Res.* 1998; 58: 1149-58.
216. Dix BR, Robbins P, Soong R, Jenner D, House AK, Iacopetta BJ. The common molecular genetic alterations in Dukes' B and C colorectal

- carcinomas are not short-term prognostic indicators of survival. *Int J Cancer* 1994; 59: 747–51.
217. Adrover E, Maestro ML, Sanz-Casla MT, del Barco V, Cerdán J, Fernández C, Balibrea JL. Expression of high p53 levels in colorectal cancer: a favourable prognostic factor. *Br J Cancer*. 1999; 81: 122-6.
218. Sigal A, Rotter V. Oncogenic mutations of the p53 tumor suppressor: the demons of the guardian of the genome. *Cancer Res*. 2000; 60: 6788-93.
219. Goh H-S, Yao J, Smith DR. p53 point mutation and survival in colorectal cancer patients. *Cancer Res* 1995; 55: 5217–21.
220. Van Meyel DJ, Ramsay DA, Casson AG, Keeney M, Chambers AF, Cairncross JG. p53 mutation, expression, and DNA ploidy in evolving gliomas: evidence for two pathways of progression. *J Natl Cancer Inst*. 1994; 86: 1011-7.
221. Top B, Mooi WJ, Klaver SG, Boerrigter L, Wisman P, Elbers HR et al. Comparative analysis of p53 gene mutations and protein accumulation in human non-small-cell lung cancer. *Int J Cancer*. 1995; 64: 83-91.
222. Pocard M, Chevillard S, Villaudy J, Poupon MF, Dutrillaux B, Remvikos Y. Different p53 mutations produce distinct effects on the ability of colon carcinoma cells to become blocked at the G1/S boundary after irradiation. *Oncogene*. 1996; 12: 875-82.
223. Toledo F, Krummel KA, Lee CJ, Liu CW, Rodewald LW, Tang M, Wahl GM. A mouse p53 mutant lacking the proline-rich domain rescues Mdm4 deficiency and provides insight into the Mdm2-Mdm4-p53 regulatory network. *Cancer Cell*. 2006; 9: 273-85.

224. Irwin MS, Kondo K, Marin MC, Cheng LS, Hahn WC, Kaelin WG Jr. Chemosensitivity linked to p73 function. *Cancer Cell*. 2003; 3: 403-10.
225. Soussi T, Hamroun D, Hjortsberg L, Rubio-Nevado JM, Fournier JL, Bérout C. MUT-TP53 2.0: a novel versatile matrix for statistical analysis of TP53 mutations in human cancer. *Hum Mutat*. 2010; 31:1020-5.

ABREVIATURAS

aa: Aminoácidos

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

AHC: Aminas heterocíclicas

AINEs: Antiinflamatorios No Esteroideos

AJCC: American Joint Comitee on Cancer

APC: Gen *Adenomatous Polyposis Coli*

ARN: Ácido Desoxirribonucleico

ARNm: Ácido Desoxirribonucleico mensajero

CA19.9: Antígeno Carbohidrato 19.9

CCHNP: Cáncer Colorrectal Hereditario No Polipósico

CCR: Cáncer Colorrectal

CdK: Ciclina Dependiente de Quinasa

CEA: Antígeno Carcinoembrionario

CIN: Inestabilidad Cromosómica

CNE: Centro Nacional de Estadística

COX: Ciclooxygenasa

DCC: Gen delecionado en CCR

DE: Desviación Estándar

dNTP: DesoxiNucleótidos Trifostato

EGF: Factor de Crecimiento Endotelial

EGFR: Receptor del Factor de Crecimiento Endotelial

GDP: Guanosin Difosfato

GTP: Guanosin Trifosfato

GTPasas: Guanosín Trifosfato Hidrolasas

HR: Hazard Ratio

IARC: Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer en el Mundo de la OMS

IC95%: Intervalo de Confianza 95%

Kb: Kilobases

KDa: KiloDalton

K-RAS: Homólogo del oncogen transformante del virus del sarcoma murino de Kirsten

LSH: Dominio Lazo-Lámina-Hélice

MAP: Poliposis asociada a MYH

MMR: "Mismatch repair"

MSI: Inestabilidad de microsatélites

MSI-H: Inestabilidad de alto grado

MSI-L: Inestabilidad de bajo grado

MSS: Estabilidad de microsatélites

MYH: Homólogo humano del gen mutY de *E.coli*

NCI: National Cancer Institute

OMS: Organización Mundial de la Salud

PAF: Poliposis Adenomatosa Familiar

pb: Par de bases nitrogenadas

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

PJ: Poliposis Juvenil

Rb: Gen asociado al Retinoblastoma

RR: Riesgo Relativo

S: Síntesis

SG: Supervivencia Global

SLE: Supervivencia Libre de Enfermedad

TGFb: Factor de Crecimiento de Trofoblastos β

TGFbRII: Receptor II del TGFb

VEGF: Factor de Crecimiento Vascular Endotelial

wt: "wilde type" (salvaje).

Anexo I

Tabla I.A.. Relación de la mutación del exón 5 del gen *p53* con las variables clinicopatológicas y los factores pronóstico clásicos. Serie de pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal en el Hospital Clínico San Carlos de Madrid (Marzo 1995-Abril 2003).

Variable		n	%	Mutado		No Mutado		p
				n	%	n	%	
Sexo	Hombres	172	52,6%	16	9,3%	156	90,7%	0,91
	Mujeres	155	47,4%	15	9,7%	140	90,3%	
Edad	≥ 71 años	169	51,7%	15	8,9%	154	91,1%	0,70
	< 71 años	158	48,3%	16	10,1%	142	89,9%	
Estadio Tumoral	A	12	3,7%	0	0,0%	12	100,0%	0,31
	B	163	49,8%	20	12,3%	143	87,7%	
	C	83	25,4%	6	7,2%	77	92,8%	
	D	69	21,1%	5	7,2%	64	92,8%	
Localización del tumor	Colon proximal	101	30,9%	7	6,9%	94	93,1%	0,14
	Colon distal	97	29,7%	14	14,4%	83	85,6%	
	Recto	129	39,4%	10	7,8%	119	92,2%	
Tipo histológico	Adenocarcinoma	302	92,4%	29	9,6%	273	90,4%	1,00
	Mucoide	25	7,6%	2	8,0%	23	92,0%	
Grado de diferenciación	I	214	73,3%	18	8,4%	196	91,6%	0,47
	II	63	21,6%	6	9,5%	57	90,5%	
	III	15	5,1%	0	0,0%	15	100,0%	

Nivel de significación: $p \leq 0,05$.

Tabla I.B.. Relación de la mutación del codón 175 (exón 5) del gen *p53* con las variables clinicopatológicas y los factores pronóstico clásicos. Serie de pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal en el Hospital Clínico San Carlos de Madrid (Marzo 1995-Abril 2003).

Variable		n	%	Mutado		No Mutado		p
				n	%	n	%	
Sexo	Hombres	172	52,6%	10	5,8%	162	94,2%	0,94
	Mujeres	155	47,4%	9	5,8%	146	94,2%	
Edad	≥ 71 años	169	51,7%	9	5,3%	160	94,7%	0,70
	< 71 años	158	48,3%	10	6,3%	148	93,7%	
Estadio Tumoral	A	12	3,7%	0	0,0%	12	100,0%	0,23
	B	163	49,8%	13	8,0%	150	92,0%	
	C	83	25,4%	4	4,8%	79	95,2%	
	D	69	21,1%	2	2,9%	67	97,1%	
Localización del tumor	Colon proximal	101	30,9%	5	5,0%	96	95,0%	0,01
	Colon distal	97	29,7%	11	11,3%	86	88,7%	
	Recto	129	39,4%	3	2,3%	126	97,7%	
Tipo histológico	Adenocarcinoma	302	92,4%	17	5,6%	285	94,4%	0,66
	Mucoide	25	7,6%	2	8,0%	23	92,0%	
Grado de diferenciación	I	214	73,3%	12	5,6%	202	94,4%	0,40
	II	63	21,6%	3	4,8%	60	95,2%	
	III	15	5,1%	0	0,0%	15	100,0%	

Nivel de significación: $p \leq 0,05$.

Tabla I.C.. Relación de la mutación del exón 6 del gen *p53* con las variables clinicopatológicas y los factores pronóstico clásicos. Serie de pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal en el Hospital Clínico San Carlos de Madrid (Marzo 1995-Abril 2003).

Variable		n	%	Mutado		No Mutado		p
				n	%	n	%	
Sexo	Hombres	183	53,5%	3	1,6%	180	98,4%	0,70
	Mujeres	159	46,5%	4	2,5%	155	97,5%	
Edad	≥ 71 años	177	51,8%	5	2,8%	172	97,2%	0,45
	< 71 años	165	48,2%	2	1,2%	163	98,8%	
Estadio Tumoral	A	12	3,5%	0	0,0%	12	100,0%	0,27
	B	170	49,7%	2	1,2%	168	98,8%	
	C	87	25,4%	3	3,4%	84	96,6%	
	D	73	21,3%	2	2,7%	71	97,3%	
Localización del tumor	Colon proximal	104	30,4%	1	1,0%	103	99,0%	0,87
	Colon distal	102	29,8%	4	3,9%	98	96,1%	
	Recto	136	39,8%	2	1,5%	134	98,5%	
Tipo histológico	Adenocarcinoma	314	91,8%	7	2,2%	307	97,8%	1,00
	Mucoide	28	8,2%	0	0,0%	28	100,0%	
Grado de diferenciación	I	224	73,2%	3	1,3%	221	98,7%	0,06
	II	66	21,6%	3	4,5%	63	95,5%	
	III	16	5,2%	1	6,3%	15	93,8%	

Nivel de significación: $p \leq 0,05$.

Tabla I.D.. Relación de la mutación del exón 7 del gen *p53* con las variables clinicopatológicas y los factores pronóstico clásicos. Serie de pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal en el Hospital Clínico San Carlos de Madrid (Marzo 1995-Abril 2003).

Variable		n	%	Mutado		No Mutado		p
				n	%	n	%	
Sexo	Hombres	178	53,1%	6	3,4%	172	96,6%	0,92
	Mujeres	157	46,9%	5	3,2%	152	96,8%	
Edad	≥ 71 años	175	52,2%	6	3,4%	169	96,6%	0,88
	< 71 años	16	4,8%	5	31,3%	155	968,8%	
Estadio Tumoral	A	12	3,6%	0	0,0%	12	100,0%	0,25
	B	165	49,3%	8	4,8%	157	95,2%	
	C	84	25,1%	2	2,4%	82	97,6%	
	D	74	22,1%	1	1,4%	73	98,6%	
Localización del tumor	Colon proximal	104	31,0%	1	1,0%	103	99,0%	0,45
	Colon distal	99	29,6%	6	6,1%	93	93,9%	
	Recto	132	39,4%	4	3,0%	128	97,0%	
Tipo histológico	Adenocarcinoma	309	92,2%	11	3,6%	298	96,4%	1,00
	Mucoide	26	7,8%	0	0,0%	26	100,0%	
Grado de diferenciación	I	221	73,7%	6	2,7%	215	97,3%	0,74
	II	63	21,0%	2	3,2%	61	96,8%	
	III	16	5,3%	0	0,0%	16	100,0%	

Nivel de significación: $p \leq 0,05$.

Tabla I.E.. Relación de la mutación del codón 248 (exón 7) del gen *p53* con las variables clinicopatológicas y los factores pronóstico clásicos. Serie de pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal en el Hospital Clínico San Carlos de Madrid (Marzo 1995-Abril 2003).

Variable		n	%	Mutado		No Mutado		p
				n	%	n	%	
Sexo	Hombres	178	53,1%	5	2,8%	173	97,2%	0,22
	Mujeres	157	46,9%	1	0,6%	156	99,4%	
Edad	≥ 71 años	175	52,2%	3	1,7%	172	98,3%	1,00
	< 71 años	16	4,8%	3	18,8%	157	981,3%	
Estadio Tumoral	A	12	3,6%	0	0,0%	12	100,0%	0,96
	B	165	49,3%	3	1,8%	162	98,2%	
	C	84	25,1%	2	2,4%	82	97,6%	
	D	74	22,1%	1	1,4%	73	98,6%	
Localización del tumor	Colon proximal	104	31,0%	0	0,0%	104	100,0%	0,24
	Colon distal	99	29,6%	3	3,0%	96	97,0%	
	Recto	132	39,4%	3	2,3%	129	97,7%	
Tipo histológico	Adenocarcinoma	309	92,2%	6	1,9%	303	98,1%	0,46
	Mucoide	26	7,8%	0	0,0%	26	100,0%	
Grado de diferenciación	I	221	73,7%	3	1,4%	218	98,6%	0,76
	II	63	21,0%	2	3,2%	61	96,8%	
	III	16	5,3%	0	0,0%	16	100,0%	

Nivel de significación: $p \leq 0,05$.

Tabla I.F.. Relación de la mutación del exón 8 del gen *p53* con las variables clinicopatológicas y los factores pronóstico clásicos. Serie de pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal en el Hospital Clínico San Carlos de Madrid (Marzo 1995-Abril 2003).

Variable		n	%	Mutado		No Mutado		p
				n	%	n	%	
Sexo	Hombres	184	53,8%	14	7,6%	170	92,4%	0,47
	Mujeres	159	46,5%	9	5,7%	150	94,3%	
Edad	≥ 71 años	178	52,0%	13	7,3%	165	92,7%	0,65
	< 71 años	165	48,2%	10	6,1%	155	93,9%	
Estadio Tumoral	A	12	3,5%	1	8,3%	11	91,7%	0,19
	B	171	50,0%	8	4,7%	163	95,3%	
	C	87	25,4%	7	8,0%	80	92,0%	
	D	73	21,3%	7	9,6%	66	90,4%	
Localización del tumor	Colon proximal	104	30,4%	7	6,7%	97	93,3%	0,63
	Colon distal	102	29,8%	5	4,9%	97	95,1%	
	Recto	137	40,1%	11	8,0%	126	92,0%	
Tipo histológico	Adenocarcinoma	315	92,1%	22	7,0%	293	93,0%	0,71
	Mucoide	18	8,2%	1	3,6%	27	60,7%	
Grado de diferenciación	I	224	73,0%	16	7,1%	208	92,9%	0,73
	II	67	21,8%	4	6,0%	63	94,0%	
	III	16	5,2%	2	12,5%	14	87,5%	

Nivel de significación: $p \leq 0,05$.

Tabla I.G.. Relación de la mutación del codón 282 (exón 8) del gen *p53* con las variables clinicopatológicas y los factores pronóstico clásicos. Serie de pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal en el Hospital Clínico San Carlos de Madrid (Marzo 1995-Abril 2003).

Variable		n	%	Mutado		No Mutado		p
				n	%	n	%	
Sexo	Hombres	184	53,8%	4	2,2%	180	97,8%	0,69
	Mujeres	159	46,5%	2	1,3%	157	98,7%	
Edad	≥ 71 años	178	52,0%	2	1,1%	176	98,9%	0,31
	< 71 años	165	48,2%	4	2,4%	161	97,6%	
Estadio Tumoral	A	12	3,5%	0	0,0%	12	100,0%	0,59
	B	171	50,0%	3	1,8%	168	98,2%	
	C	87	25,4%	1	1,1%	86	98,9%	
	D	73	21,3%	2	2,7%	71	97,3%	
Localización del tumor	Colon proximal	104	30,4%	3	2,9%	101	97,1%	0,43
	Colon distal	102	29,8%	1	1,0%	101	99,0%	
	Recto	137	40,1%	2	1,5%	135	98,5%	
Tipo histológico	Adenocarcinoma	315	92,1%	6	1,9%	309	98,1%	1,00
	Mucoide	28	8,2%	0	0,0%	28	100,0%	
Grado de diferenciación	I	224	73,0%	3	1,3%	221	98,7%	0,13
	II	67	21,8%	2	3,0%	65	97,0%	
	III	16	5,2%	1	6,3%	15	93,8%	

Nivel de significación: $p \leq 0,05$.

Tabla I.H.. Relación de la mutación del codón 288 (exón 8) del gen *p53* con las variables clinicopatológicas y los factores pronóstico clásicos. Serie de pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal en el Hospital Clínico San Carlos de Madrid (Marzo 1995-Abril 2003).

Variable		n	%	Mutado		No Mutado		p
				n	%	n	%	
Sexo	Hombres	184	53,8%	2	1,1%	182	98,9%	1,00
	Mujeres	159	46,5%	2	1,3%	157	98,7%	
Edad	≥ 71 años	178	52,0%	2	1,1%	176	98,9%	1,00
	< 71 años	165	48,2%	2	1,2%	163	98,8%	
Estadio Tumoral	A	12	3,5%	0	0,0%	12	100,0%	0,16
	B	171	50,0%	1	0,6%	170	99,4%	
	C	87	25,4%	1	1,1%	86	98,9%	
	D	73	21,3%	2	2,7%	71	97,3%	
Localización del tumor	Colon proximal	104	30,4%	0	0,0%	104	100,0%	0,03
	Colon distal	102	29,8%	0	0,0%	102	100,0%	
	Recto	137	40,1%	4	2,9%	133	97,1%	
Tipo histológico	Adenocarcinoma	315	92,1%	4	1,3%	311	98,7%	1,00
	Mucoide	28	8,2%	0	0,0%	28	100,0%	
Grado de diferenciación	I	224	73,0%	2	0,9%	222	99,1%	0,53
	II	67	21,8%	2	3,0%	65	97,0%	
	III	16	5,2%	0	0,0%	16	100,0%	

Nivel de significación: $p \leq 0,05$.

Tabla I.I.. Relación de la mutación del codón 289 (exón 8) del gen *p53* con las variables clinicopatológicas y los factores pronóstico clásicos. Serie de pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal en el Hospital Clínico San Carlos de Madrid (Marzo 1995-Abril 2003).

Variable		n	%	Mutado		No Mutado		p
				n	%	n	%	
Sexo	Hombres	184	53,8%	1	0,5%	183	99,5%	0,34
	Mujeres	159	46,5%	3	1,9%	156	98,1%	
Edad	≥ 71 años	178	52,0%	3	1,7%	175	98,3%	0,62
	< 71 años	165	48,2%	1	0,6%	164	99,4%	
Estadio Tumoral	A	12	3,5%	1	8,3%	11	91,7%	0,73
	B	171	50,0%	1	0,6%	170	99,4%	
	C	87	25,4%	1	1,1%	86	98,9%	
	D	73	21,3%	1	1,4%	72	98,6%	
Localización del tumor	Colon proximal	104	30,4%	1	1,0%	103	99,0%	0,72
	Colon distal	102	29,8%	1	1,0%	101	99,0%	
	Recto	137	40,1%	2	1,5%	135	98,5%	
Tipo histológico	Adenocarcinoma	315	92,1%	4	1,3%	311	98,7%	1,00
	Mucoide	28	8,2%	0	0,0%	28	100,0%	
Grado de diferenciación	I	224	73,0%	4	1,8%	220	98,2%	0,26
	II	67	21,8%	0	0,0%	67	100,0%	
	III	16	5,2%	0	0,0%	16	100,0%	

Nivel de significación: $p \leq 0,0$

Anexo II

Tabla II.A. Análisis estratificado de la supervivencia global en función de las mutaciones totales del gen *p53*. *Serie de pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos. (Marzo 1995-Abril 2003)*

Variable		p53 Total	SG (86 meses)	p
Sexo	Hombre	Mutado	59,3%	0,60
		No Mutado	60,1%	
	Mujer	Mutado	68,3%	0,63
		No Mutado	65,2%	
Edad	> 71 años	Mutado	58,9%	0,48
		No Mutado	57,7%	
	< 71 años	Mutado	66,7%	0,53
		No Mutado	67,2%	
Estadio Tumoral	A+B	Mutado	84,1%	0,74
		No Mutado	86,8%	
	C	Mutado	64,6%	0,79
		No Mutado	59,7%	
	D	Mutado	7,7%	0,98
		No Mutado	8,3%	
Localización del Tumor	Colon proximal	Mutado	41,4%	0,05
		No Mutado	60,5%	
	Colon distal	Mutado	74,2%	0,06
		No Mutado	56,0%	
	Recto	Mutado	66,9%	0,72
		No Mutado	68,4%	
Tipo histológico	Adenocarcinoma	Mutado	64,2%	0,95
		No Mutado	64,2%	
	Mucinoso	Mutado	50,0%	0,70
		No Mutado	43,5%	
Grado de diferenciación	I	Mutado	70,7%	0,65
		No Mutado	65,0%	
	II	Mutado	37,4%	0,37
		No Mutado	58,5%	
	III	Mutado	50,0%	0,48
		No Mutado	50,0%	
MSI	MSS	Mutado	60,8%	0,92
		No Mutado	59,5%	
	MSI-L	Mutado	80,0%	0,88
		No Mutado	70,3%	
	MSI-H	Mutado	100,0%	0,49
		No Mutado	80,1%	

SG: supervivencia global acumulada. HR: hazard ratio. IC95%: intervalo de confianza 95%
 Nivel de significación: $p \leq 0,05$. Tendencia: $p < 0,1$.

Tabla II.B. Análisis estratificado de la supervivencia global en función de las mutaciones del exón 5 del gen *p53*. *Serie de pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos. (Marzo 1995-Abril 2003)*

Variable		Exón 5	SG (86 meses)	p
Sexo	Hombre	Mutado	84,6%	0,16
		No Mutado	59,1%	
	Mujer	Mutado	53,3%	0,23
		No Mutado	68,0%	
Edad	> 71 años	Mutado	51,3%	0,86
		No Mutado	60,5%	
	< 71 años	Mutado	80,0%	0,46
		No Mutado	66,4%	
Estadio Tumoral	A+B	Mutado	82,4%	0,42
		No Mutado	88,5%	
	C	Mutado	62,5%	0,95
		No Mutado	61,5%	
	D	Mutado	20,0%	0,84
		No Mutado	6,0%	
Localización del Tumor	Colon proximal	Mutado	50,0%	0,36
		No Mutado	58,9%	
	Colon distal	Mutado	91,7%	0,03
		No Mutado	57,6%	
	Recto	Mutado	46,7%	0,14
		No Mutado	70,8%	
Tipo histológico	Adenocarcinoma	Mutado	66,1%	0,92
		No Mutado	65,2%	
	Mucinoso	Mutado	100,0%	0,39
		No Mutado	42,8%	
Grado de diferenciación	I	Mutado	76,0%	0,60
		No Mutado	67,0%	
	II	Mutado	33,3%	0,43
		No Mutado	58,2%	
	III	Mutado	--	--
		No Mutado	41,5%	
MSI	MSS	Mutado	60,9%	0,99
		No Mutado	60,8%	
	MSI-L	Mutado	100,0%	0,35
		No Mutado	68,5%	
	MSI-H	Mutado	100,0%	0,51
		No Mutado	70,0%	

SG: supervivencia global acumulada. HR: hazard ratio. IC95%: intervalo de confianza 95%

Nivel de significación: $p \leq 0,05$. Tendencia: $p < 0,1$.

Tabla II.C. Análisis estratificado de la supervivencia global en función de las mutaciones del codón 175 (exón 5) del gen *p53*. *Serie de pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos. (Marzo 1995-Abril 2003)*

Variable		Codón 175	SG (86 meses)	p
Sexo	Hombre	Mutado	100,0%	0,05
		No Mutado	58,4%	
	Mujer	Mutado	77,8%	0,55
		No Mutado	64,6%	
Edad	> 71 años	Mutado	71,4%	0,52
		No Mutado	57,8%	
	< 71 años	Mutado	100,0%	0,05
		No Mutado	64,8%	
Estadio Tumoral	A+B	Mutado	100,0%	0,22
		No Mutado	85,5%	
	C	Mutado	75,0%	0,50
		No Mutado	60,0%	
	D	Mutado	50,0%	0,50
		No Mutado	4,6%	
Localización del Tumor	Colon proximal	Mutado	75,0%	0,64
		No Mutado	56,8%	
	Colon distal	Mutado	88,9%	0,09
		No Mutado	57,6%	
	Recto	Mutado	100,0%	0,28
		No Mutado	67,1%	
Tipo histológico	Adenocarcinoma	Mutado	86,7%	0,09
		No Mutado	63,2%	
	Mucinoso	Mutado	100,0%	0,38
		No Mutado	41,7%	
Grado de diferenciación	I	Mutado	90,9%	0,14
		No Mutado	64,3%	
	II	Mutado	66,7%	0,50
		No Mutado	54,7%	
	III	Mutado	--	--
		No Mutado	47,6%	
MSI	MSS	Mutado	85,7%	0,07
		No Mutado	58,0%	
	MSI-L	Mutado	100,0%	0,58
		No Mutado	71,6%	
	MSI-H	Mutado	100,0%	0,66
		No Mutado	81,6%	

SG: supervivencia global acumulada. HR: hazard ratio. IC95%: intervalo de confianza 95%
 Nivel de significación: $p \leq 0,05$. Tendencia: $p < 0,1$.

Tabla II.D. Análisis estratificado de la supervivencia global en función de las mutaciones del exón 6 del gen *p53*. *Serie de pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos. (Marzo 1995-Abril 2003)*

Variable		Exón 6	SG (86 meses)	p
Sexo	Hombre	Mutado	50,0%	0,78
		No Mutado	60,1%	
	Mujer	Mutado	66,7%	0,96
		No Mutado	65,8%	
Edad	> 71 años	Mutado	66,7%	0,57
		No Mutado	58,0%	
	< 71 años	Mutado	50,0%	0,61
		No Mutado	67,5%	
Estadio Tumoral	A+B	Mutado	100,0%	0,60
		No Mutado	86,1%	
	C	Mutado	50,0%	0,92
		No Mutado	61,0%	
	D	Mutado	0,0%	0,57
		No Mutado	8,4%	
Localización del Tumor	Colon proximal	Mutado	100,0%	0,66
		No Mutado	57,6%	
	Colon distal	Mutado	66,7%	0,78
		No Mutado	60,7%	
	Recto	Mutado	50,0%	0,52
		No Mutado	68,4%	
Tipo histológico	Adenocarcinoma	Mutado	60,0%	0,93
		No Mutado	64,6%	
	Mucinoso	Mutado	--	--
		No Mutado	44,1%	
Grado de diferenciación	I	Mutado	66,7%	0,94
		No Mutado	66,2%	
	II	Mutado	100,0%	0,35
		No Mutado	53,1%	
	III	Mutado	0,0%	0,89
		No Mutado	55,4%	
MSI	MSS	Mutado	60,0%	0,77
		No Mutado	59,8%	
	MSI-L	Mutado	--	--
		No Mutado	71,6%	
	MSI-H	Mutado	--	--
		No Mutado	82,7%	

SG: supervivencia global acumulada. HR: hazard ratio. IC95%: intervalo de confianza 95%
 Nivel de significación: $p \leq 0,05$. Tendencia: $p < 0,1$.

Tabla II.E. Análisis estratificado de la supervivencia global en función de las mutaciones del exón 7 del gen *p53*. *Serie de pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos. (Marzo 1995-Abril 2003)*

Variable		Exón 7	SG (86 meses)	p
Sexo	Hombre	Mutado	62,5%	0,74
		No Mutado	58,5%	
	Mujer	Mutado	80,0%	0,32
		No Mutado	65,0%	
Edad	> 71 años	Mutado	75,0%	0,16
		No Mutado	57,0%	
	< 71 años	Mutado	60,0%	0,76
		No Mutado	66,4%	
Estadio Tumoral	A+B	Mutado	85,7%	0,73
		No Mutado	86,6%	
	C	Mutado	0,0%	0,33
		No Mutado	59,9%	
	D	Mutado	0,0%	0,71
		No Mutado	8,4%	
Localización del Tumor	Colon proximal	Mutado	100,0%	0,47
		No Mutado	57,2%	
	Colon distal	Mutado	50,0%	0,96
		No Mutado	61,6%	
	Recto	Mutado	100,0%	0,24
		No Mutado	65,3%	
Tipo histológico	Adenocarcinoma	Mutado	69,3%	0,42
		No Mutado	63,7%	
	Mucinoso	Mutado	--	--
		No Mutado	39,1%	
Grado de diferenciación	I	Mutado	60,0%	0,74
		No Mutado	65,4%	
	II	Mutado	50,0%	0,92
		No Mutado	53,9%	
	III	Mutado	--	--
		No Mutado	47,6%	
MSI	MSS	Mutado	72,9%	0,25
		No Mutado	58,8%	
	MSI-L	Mutado	66,7%	0,55
		No Mutado	79,7%	
	MSI-H	Mutado	--	--
		No Mutado	81,6%	

SG: supervivencia global acumulada. HR: hazard ratio. IC95%: intervalo de confianza 95%
 Nivel de significación: $p \leq 0,05$. Tendencia: $p < 0,1$.

Tabla II.F. Análisis estratificado de la supervivencia global en función de las mutaciones del codón 248 (exón 7) del gen *p53*. *Serie de pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos. (Marzo 1995-Abril 2003)*

Variable		Codón 248	SG (86 meses)	p
Sexo	Hombre	Mutado	60,4%	0,95
		No Mutado	53,3%	
	Mujer	Mutado	100,0%	0,52
		No Mutado	64,9%	
Edad	> 71 años	Mutado	100,0%	0,27
		No Mutado	57,5%	
	< 71 años	Mutado	33,3%	0,18
		No Mutado	67,5%	
Estadio Tumoral	A+B	Mutado	100,0%	0,52
		No Mutado	86,1%	
	C	Mutado	0,0%	0,31
		No Mutado	61,4%	
	D	Mutado	0,0%	0,71
		No Mutado	8,3%	
Localización del Tumor	Colon proximal	Mutado	--	--
		No Mutado	57,3%	
	Colon distal	Mutado	33,3%	0,35
		No Mutado	61,6%	
	Recto	Mutado	100,0%	0,35
		No Mutado	67,3%	
Tipo histológico	Adenocarcinoma	Mutado	62,5%	0,97
		No Mutado	64,3%	
	Mucinoso	Mutado	--	--
		No Mutado	44,1%	
Grado de diferenciación	I	Mutado	50,0%	0,88
		No Mutado	65,8%	
	II	Mutado	50,0%	0,97
		No Mutado	55,2%	
	III	Mutado	--	--
		No Mutado	47,6%	
MSI	MSS	Mutado	75,0%	0,53
		No Mutado	59,4%	
	MSI-L	Mutado	50,0%	0,17
		No Mutado	74,7%	
	MSI-H	Mutado	--	--
		No Mutado	82,7%	

SG: supervivencia global acumulada. HR: hazard ratio. IC95%: intervalo de confianza 95%
 Nivel de significación: $p \leq 0,05$. Tendencia: $p < 0,1$.

Tabla II.G. Análisis estratificado de la supervivencia global en función de las mutaciones del exón 8 del gen *p53*. *Serie de pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos. (Marzo 1995-Abril 2003)*

Variable		Exón 8	SG (86 meses)	p
Sexo	Hombre	Mutado	35,7%	0,09
		No Mutado	62,5%	
	Mujer	Mutado	87,5%	0,28
		No Mutado	64,7%	
Edad	> 71 años	Mutado	56,4%	0,79
		No Mutado	58,6%	
	< 71 años	Mutado	50,0%	0,07
		No Mutado	68,4%	
Estadio Tumoral	A+B	Mutado	88,9%	0,74
		No Mutado	86,4%	
	C	Mutado	71,4%	0,60
		No Mutado	59,6%	
	D	Mutado	0,0%	0,74
		No Mutado	7,0%	
Localización del Tumor	Colon proximal	Mutado	19,0%	0,01
		No Mutado	60,5%	
	Colon distal	Mutado	60,0%	0,93
		No Mutado	60,7%	
	Recto	Mutado	72,7%	0,99
		No Mutado	68,0%	
Tipo histológico	Adenocarcinoma	Mutado	56,7%	0,25
		No Mutado	65,3%	
	Mucinoso	Mutado	0,0%	0,01
		No Mutado	45,9%	
Grado de diferenciación	I	Mutado	67,3%	0,69
		No Mutado	66,1%	
	II	Mutado	25,0%	0,12
		No Mutado	57,2%	
	III	Mutado	50,0%	0,48
		No Mutado	50,0%	
MSI	MSS	Mutado	50,1%	0,18
		No Mutado	60,6%	
	MSI-L	Mutado	100,0%	0,58
		No Mutado	71,6%	
	MSI-H	Mutado	100,0%	0,82
		No Mutado	82,5%	

SG: supervivencia global acumulada. HR: hazard ratio. IC95%: intervalo de confianza 95%
 Nivel de significación: $p \leq 0,05$. Tendencia: $p < 0,1$.

Tabla II.H. Análisis estratificado de la supervivencia global en función de las mutaciones del codón 282 (exón 8) del gen *p53*. *Serie de pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos. (Marzo 1995-Abril 2003)*

Variable		Codón 282	SG (86 meses)	p
Sexo	Hombre	Mutado	50,0%	0,29
		No Mutado	60,5%	
	Mujer	Mutado	100,0%	0,46
		No Mutado	64,8%	
Edad	> 71 años	Mutado	0,0%	0,39
		No Mutado	58,4%	
	< 71 años	Mutado	75,0%	0,97
		No Mutado	66,6%	
Estadio Tumoral	A+B	Mutado	100,0%	0,58
		No Mutado	86,2%	
	C	Mutado	100,0%	0,49
		No Mutado	60,2%	
	D	Mutado	0,0%	0,22
		No Mutado	8,5%	
Localización del Tumor	Colon proximal	Mutado	0,0%	0,04
		No Mutado	58,3%	
	Colon distal	Mutado	100,0%	0,49
		No Mutado	60,3%	
	Recto	Mutado	100,0%	0,38
		No Mutado	67,3%	
Tipo histológico	Adenocarcinoma	Mutado	62,5%	0,56
		No Mutado	64,3%	
	Mucinoso	Mutado	--	--
		No Mutado	44,1%	
Grado de diferenciación	I	Mutado	100,0%	0,34
		No Mutado	65,3%	
	II	Mutado	0,0%	0,01
		No Mutado	56,8%	
	III	Mutado	100,0%	0,42
		No Mutado	41,5%	
MSI	MSS	Mutado	62,5%	0,73
		No Mutado	59,5%	
	MSI-L	Mutado	--	--
		No Mutado	72,6%	
	MSI-H	Mutado	--	--
		No Mutado	82,7%	

SG: supervivencia global acumulada. HR: hazard ratio. IC95%: intervalo de confianza 95%

Nivel de significación: $p \leq 0,05$. Tendencia: $p < 0,1$.

Tabla II.I. Análisis estratificado de la supervivencia global en función de las mutaciones del codón 288 (exón 8) del gen *p53*. *Serie de pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos. (Marzo 1995-Abril 2003)*

Variable		Codón 288	SG (86 meses)	p
Sexo	Hombre	Mutado	50,0%	0,78
		No Mutado	60,4%	
	Mujer	Mutado	50,0%	0,46
		No Mutado	65,5%	
Edad	> 71 años	Mutado	100,0%	0,36
		No Mutado	57,7%	
	< 71 años	Mutado	0,0%	0,16
		No Mutado	67,7%	
Estadio Tumoral	A+B	Mutado	100,0%	0,80
		No Mutado	86,3%	
	C	Mutado	100,0%	0,51
		No Mutado	60,3%	
	D	Mutado	0,0%	0,50
		No Mutado	8,5%	
Localización del Tumor	Colon proximal	Mutado	--	--
		No Mutado	57,3%	
	Colon distal	Mutado	--	--
		No Mutado	60,7%	
	Recto	Mutado	50,0%	0,28
		No Mutado	68,3%	
Tipo histológico	Adenocarcinoma	Mutado	50,0%	0,51
		No Mutado	64,6%	
	Mucinoso	Mutado	--	--
		No Mutado	44,1%	
Grado de diferenciación	I	Mutado	50,0%	0,61
		No Mutado	65,8%	
	II	Mutado	50,0%	0,98
		No Mutado	55,4%	
	III	Mutado	--	--
		No Mutado	47,6%	
MSI	MSS	Mutado	50,0%	0,67
		No Mutado	59,8%	
	MSI-L	Mutado	--	--
		No Mutado	72,6%	
	MSI-H	Mutado	--	--
		No Mutado	82,7%	

SG: supervivencia global acumulada. HR: hazard ratio. IC95%: intervalo de confianza 95%
 Nivel de significación: $p \leq 0,05$. Tendencia: $p < 0,1$.

Tabla II.J. Análisis estratificado de la supervivencia global en función de las mutaciones del codón 289 (exón 8) del gen *p53*. *Serie de pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos. (Marzo 1995-Abril 2003)*

Variable		Codón 289	SG (86 meses)	p
Sexo	Hombre	Mutado	0,0%	0,05
		No Mutado	60,6%	
	Mujer	Mutado	100,0%	0,31
		No Mutado	64,5%	
Edad	> 71 años	Mutado	66,7%	0,82
		No Mutado	58,1%	
	< 71 años	Mutado	100,0%	0,52
		No Mutado	66,6%	
Estadio Tumoral	A+B	Mutado	100,0%	0,66
		No Mutado	86,2%	
	C	Mutado	100,0%	0,49
		No Mutado	60,2%	
	D	Mutado	0,0%	0,50
		No Mutado	8,3%	
Localización del Tumor	Colon proximal	Mutado	100,0%	0,57
		No Mutado	57,0%	
	Colon distal	Mutado	100,0%	0,49
		No Mutado	60,3%	
	Recto	Mutado	50,0%	0,25
		No Mutado	68,1%	
Tipo histológico	Adenocarcinoma	Mutado	75,0%	0,95
		No Mutado	64,2%	
	Mucinoso	Mutado	--	--
		No Mutado	44,1%	
Grado de diferenciación	I	Mutado	75,0%	0,94
		No Mutado	65,6%	
	II	Mutado	--	--
		No Mutado	55,0%	
	III	Mutado	--	--
		No Mutado	47,6	
MSI	MSS	Mutado	66,7%	0,96
		No Mutado	59,5%	
	MSI-L	Mutado	--	--
		No Mutado	72,6%	
	MSI-H	Mutado	100,0%	0,82
		No Mutado	82,5%	

SG: supervivencia global acumulada. HR: hazard ratio. IC95%: intervalo de confianza 95%

Nivel de significación: $p \leq 0,05$. Tendencia: $p < 0,1$.

Anexo III

Tabla III.A. Análisis estratificado de la supervivencia libre de enfermedad en función de las mutaciones totales del gen *p53*. *Serie de pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos. (Marzo 1995-Abril 2003)*

Variable		p53 Total	SLE (86 meses)	p
Sexo	Hombre	Mutado	78,3%	0,37
		No Mutado	65,8%	
	Mujer	Mutado	54,9%	0,10
		No Mutado	74,9%	
Edad	> 71 años	Mutado	59,4%	0,58
		No Mutado	70,7%	
	< 71 años	Mutado	72,7%	0,08
		No Mutado	69,9%	
Estadio Tumoral	A+B	Mutado	75,6%	0,41
		No Mutado	83,5%	
	C	Mutado	44,6%	0,66
		No Mutado	55,1%	
	D	Mutado	50,0%	0,62
		No Mutado	11,5%	
Localización del Tumor	Colon proximal	Mutado	77,8%	0,64
		No Mutado	73,7%	
	Colon distal	Mutado	60,3%	0,79
		No Mutado	61,5%	
	Recto	Mutado	69,7%	0,99
		No Mutado	73,2%	
Tipo histológico	Adenocarcinoma	Mutado	65,0%	0,48
		No Mutado	73,2%	
	Mucinoso	Mutado	100,0%	0,42
		No Mutado	48,5%	
Grado de diferenciación	I	Mutado	66,5%	0,62
		No Mutado	70,2%	
	II	Mutado	47,6%	0,17
		No Mutado	75,2%	
	III	Mutado	50,0%	0,82
		No Mutado	60,0%	
MSI	MSS	Mutado	61,0%	0,52
		No Mutado	68,1%	
	MSI-L	Mutado	100,0%	0,34
		No Mutado	76,7%	
	MSI-H	Mutado	100,0%	0,47
		No Mutado	81,1%	

SLE: supervivencia libre de enfermedad acumulada. HR: hazard ratio. IC95%: intervalo de confianza 95% Nivel de significación: $p \leq 0,05$. Tendencia: $p < 0,1$.

Tabla III.B. Análisis estratificado de la supervivencia libre de enfermedad en función de las mutaciones del exón 5 del gen *p53*. *Serie de pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos. (Marzo 1995-Abril 2003)*

Variable		Exón 5	SLE (86 meses)	p
Sexo	Hombre	Mutado	100,0%	0,04
		No Mutado	67,7%	
	Mujer	Mutado	35,7%	<0,001
		No Mutado	75,1%	
Edad	> 71 años	Mutado	56,6%	0,33
		No Mutado	70,7%	
	< 71 años	Mutado	69,2%	0,80
		No Mutado	72,3%	
Estadio Tumoral	A+B	Mutado	70,8%	0,13
		No Mutado	85,3%	
	C	Mutado	44,4%	0,79
		No Mutado	54,4%	
	D	Mutado	50,0%	0,72
		No Mutado	12,5%	
Localización del Tumor	Colon proximal	Mutado	75,0%	0,79
		No Mutado	73,1%	
	Colon distal	Mutado	75,0%	0,39
		No Mutado	62,0%	
	Recto	Mutado	38,9%	0,03
		No Mutado	76,6%	
Tipo histológico	Adenocarcinoma	Mutado	61,7%	0,22
		No Mutado	73,7%	
	Mucinoso	Mutado	100,0%	0,40
		No Mutado	45,3%	
Grado de diferenciación	I	Mutado	72,2%	0,84
		No Mutado	72,6%	
	II	Mutado	20,0%	0,04
		No Mutado	78,9%	
	III	Mutado	--	--
		No Mutado	63,3%	
MSI	MSS	Mutado	55,1%	0,19
		No Mutado	68,9%	
	MSI-L	Mutado	100,0%	0,49
		No Mutado	81,3%	
	MSI-H	Mutado	100,0%	0,52
		No Mutado	80,5%	

SLE: supervivencia libre de enfermedad acumulada. HR: hazard ratio. IC95%: intervalo de confianza 95% Nivel de significación: $p \leq 0,05$. Tendencia: $p < 0,1$.

Tabla III.C. Análisis estratificado de la supervivencia libre de enfermedad en función de las mutaciones codón 175 (exón 5) del gen *p53*. *Serie de pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos. (Marzo 1995-Abril 2003)*

Variable		Codón 175	SLE (86 meses)	p
Sexo	Hombre	Mutado	100,0%	0,09
		No Mutado	66,4%	
	Mujer	Mutado	50,0%	0,18
		No Mutado	71,9%	
Edad	> 71 años	Mutado	83,3%	0,48
		No Mutado	67,7%	
	< 71 años	Mutado	66,7%	0,92
		No Mutado	70,7%	
Estadio Tumoral	A+B	Mutado	80,0%	0,96
		No Mutado	82,1%	
	C	Mutado	50,0%	0,97
		No Mutado	53,3%	
	D	Mutado	100,0%	0,23
		No Mutado	10,7%	
Localización del Tumor	Colon proximal	Mutado	100,0%	0,33
		No Mutado	72,5%	
	Colon distal	Mutado	66,7%	0,65
		No Mutado	60,1%	
	Recto	Mutado	66,7%	0,96
		No Mutado	75,1%	
Tipo histológico	Adenocarcinoma	Mutado	71,4%	0,84
		No Mutado	70,9%	
	Mucinoso	Mutado	100,0%	0,42
		No Mutado	48,5%	
Grado de diferenciación	I	Mutado	80,0%	0,55
		No Mutado	70,4%	
	II	Mutado	33,3%	0,26
		No Mutado	74,2%	
	III	Mutado	--	--
		No Mutado	58,3%	
MSI	MSS	Mutado	66,4%	0,72
		No Mutado	69,2%	
	MSI-L	Mutado	100,0%	0,64
		No Mutado	80,0%	
	MSI-H	Mutado	100,0%	0,67
		No Mutado	82,8%	

SLE: supervivencia libre de enfermedad acumulada. HR: hazard ratio. IC95%: intervalo de confianza 95% Nivel de significación: $p \leq 0,05$. Tendencia: $p < 0,1$.

Tabla III.D. Análisis estratificado de la supervivencia libre de enfermedad en función de las mutaciones del exón 6 del gen *p53*. *Serie de pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos. (Marzo 1995-Abril 2003)*

Variable		Exón 6	SLE (86 meses)	p
Sexo	Hombre	Mutado	0,0%	0,14
		No Mutado	69,1%	
	Mujer	Mutado	100,0%	0,42
		No Mutado	70,1%	
Edad	> 71 años	Mutado	33,3%	0,38
		No Mutado	69,1%	
	< 71 años	Mutado	100,0%	0,56
		No Mutado	70,2%	
Estadio Tumoral	A+B	Mutado	50,0%	0,33
		No Mutado	82,3%	
	C	Mutado	50,0%	0,99
		No Mutado	53,1%	
	D	Mutado	--	--
		No Mutado	17,8%	
Localización del Tumor	Colon proximal	Mutado	100,0%	0,15
		No Mutado	73,6%	
	Colon distal	Mutado	33,3%	0,38
		No Mutado	62,1%	
	Recto	Mutado	100,0%	0,57
		No Mutado	72,3%	
Tipo histológico	Adenocarcinoma	Mutado	50,0%	0,50
		No Mutado	71,1%	
	Mucinoso	Mutado	--	--
		No Mutado	51,3%	
Grado de diferenciación	I	Mutado	50,0%	0,70
		No Mutado	71,3%	
	II	Mutado	100,0%	0,51
		No Mutado	69,7%	
	III	Mutado	0,0%	0,66
		No Mutado	63,6%	
MSI	MSS	Mutado	50,0%	0,65
		No Mutado	66,9%	
	MSI-L	Mutado	--	--
		No Mutado	80,0%	
	MSI-H	Mutado	--	--
		No Mutado	83,7%	

SLE: supervivencia libre de enfermedad acumulada. HR: hazard ratio. IC95%: intervalo de confianza 95% Nivel de significación: $p \leq 0,05$. Tendencia: $p < 0,1$.

Tabla III.E. Análisis estratificado de la supervivencia libre de enfermedad en función de las mutaciones del exón 7 del gen *p53*. *Serie de pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos. (Marzo 1995-Abril 2003)*

Variable		Exón 7	SLE (86 meses)	p
Sexo	Hombre	Mutado	80,0%	0,81
		No Mutado	66,2%	
	Mujer	Mutado	80,0%	0,43
		No Mutado	71,4%	
Edad	> 71 años	Mutado	75,0%	0,30
		No Mutado	67,3%	
	< 71 años	Mutado	75,0%	0,95
		No Mutado	69,6%	
Estadio Tumoral	A+B	Mutado	85,7%	0,51
		No Mutado	81,7%	
	C	Mutado	50,0%	0,25
		No Mutado	51,8%	
	D	Mutado	--	--
		No Mutado	17,8%	
Localización del Tumor	Colon proximal	Mutado	100,0%	0,58
		No Mutado	73,3%	
	Colon distal	Mutado	60,0%	0,96
		No Mutado	61,0%	
	Recto	Mutado	100,0%	0,27
		No Mutado	70,3%	
Tipo histológico	Adenocarcinoma	Mutado	77,1%	0,52
		No Mutado	70,2%	
	Mucinoso	Mutado	--	--
		No Mutado	45,3%	
Grado de diferenciación	I	Mutado	62,5%	0,79
		No Mutado	70,6%	
	II	Mutado	100,0%	0,56
		No Mutado	70,3%	
	III	Mutado	--	--
		No Mutado	58,3%	
MSI	MSS	Mutado	72,9%	0,57
		No Mutado	65,9%	
	MSI-L	Mutado	100,0%	0,55
		No Mutado	78,7%	
	MSI-H	Mutado	--	--
		No Mutado	82,8%	

SLE: supervivencia libre de enfermedad acumulada. HR: hazard ratio. IC95%: intervalo de confianza 95% Nivel de significación: $p \leq 0,05$. Tendencia: $p < 0,1$.

Tabla III.F. Análisis estratificado de la supervivencia libre de enfermedad en función de las mutaciones del codón 248 (exón 7) del gen *p53*. *Serie de pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos. (Marzo 1995-Abril 2003)*

Variable		Codón 248	SLE (86 meses)	p
Sexo	Hombre	Mutado	75,0%	0,89
		No Mutado	68,1%	
	Mujer	Mutado	100,0%	0,56
		No Mutado	70,3%	
Edad	> 71 años	Mutado	100,0%	0,33
		No Mutado	67,9%	
	< 71 años	Mutado	50,0%	0,21
		No Mutado	70,7%	
Estadio Tumoral	A+B	Mutado	100,0%	0,44
		No Mutado	81,6%	
	C	Mutado	50,0%	0,23
		No Mutado	53,5%	
	D	Mutado	--	--
		No Mutado	17,8%	
Localización del Tumor	Colon proximal	Mutado	--	--
		No Mutado	73,7%	
	Colon distal	Mutado	50,0%	0,29
		No Mutado	61,2%	
	Recto	Mutado	100,0%	0,38
		No Mutado	72,2%	
Tipo histológico	Adenocarcinoma	Mutado	80,0%	0,96
		No Mutado	70,8%	
	Mucinoso	Mutado	--	--
		No Mutado	51,3%	
Grado de diferenciación	I	Mutado	66,7%	0,37
		No Mutado	71,7%	
	II	Mutado	100,0%	0,56
		No Mutado	70,6%	
	III	Mutado	--	--
		No Mutado	58,3%	
MSI	MSS	Mutado	66,4%	0,98
		No Mutado	75,0%	
	MSI-L	Mutado	100,0%	0,73
		No Mutado	80,4%	
	MSI-H	Mutado	--	--
		No Mutado	83,7%	

SLE: supervivencia libre de enfermedad acumulada. HR: hazard ratio. IC95%: intervalo de confianza 95% Nivel de significación: $p \leq 0,05$. Tendencia: $p < 0,1$.

Tabla III.G. Análisis estratificado de la supervivencia libre de enfermedad en función de las mutaciones del exón 8 del gen *p53*. Serie de pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos. (Marzo 1995-Abril 2003)

Variable		Exón 8	SLE (86 meses)	p
Sexo	Hombre	Mutado	62,5%	0,45
		No Mutado	68,6%	
	Mujer	Mutado	60,0%	0,67
		No Mutado	70,8%	
Edad	> 71 años	Mutado	57,3%	0,51
		No Mutado	69,4%	
	< 71 años	Mutado	80,0%	0,49
		No Mutado	70,0%	
Estadio Tumoral	A+B	Mutado	88,9%	0,87
		No Mutado	81,7%	
	C	Mutado	42,9%	0,92
		No Mutado	54,4%	
	D	Mutado	--	--
		No Mutado	17,8%	
Localización del Tumor	Colon proximal	Mutado	66,7%	0,26
		No Mutado	74,4%	
	Colon distal	Mutado	40,0%	0,40
		No Mutado	62,4%	
	Recto	Mutado	85,7%	0,29
		No Mutado	71,8%	
Tipo histológico	Adenocarcinoma	Mutado	64,6%	0,76
		No Mutado	71,3%	
	Mucinoso	Mutado	--	--
		No Mutado	51,3%	
Grado de diferenciación	I	Mutado	65,8%	0,81
		No Mutado	71,3%	
	II	Mutado	100,0%	0,60
		No Mutado	70,7%	
	III	Mutado	50,0%	0,82
		No Mutado	60,0%	
MSI	MSS	Mutado	60,6%	0,76
		No Mutado	66,9%	
	MSI-L	Mutado	100,0%	0,64
		No Mutado	80,0%	
	MSI-H	Mutado	100,0%	0,74
		No Mutado	83,3%	

SLE: supervivencia libre de enfermedad acumulada. HR: hazard ratio. IC95%: intervalo de confianza 95% Nivel de significación: $p \leq 0,05$. Tendencia: $p < 0,1$.

Tabla III.H. Análisis estratificado de la supervivencia libre de enfermedad en función de las mutaciones codón 282 (exón 8) del gen *p53*. *Serie de pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos. (Marzo 1995-Abril 2003)*

Variable		Codón 282	SLE (86 meses)	p
Sexo	Hombre	Mutado	100,0%	0,38
		No Mutado	67,7%	
	Mujer	Mutado	100,0%	0,52
		No Mutado	70,2%	
Edad	> 71 años	Mutado	100,0%	0,71
		No Mutado	68,4%	
	< 71 años	Mutado	100,0%	0,30
		No Mutado	69,7%	
Estadio Tumoral	A+B	Mutado	100,0%	0,50
		No Mutado	81,7%	
	C	Mutado	100,0%	0,44
		No Mutado	52,5%	
	D	Mutado	--	--
		No Mutado	17,8%	
Localización del Tumor	Colon proximal	Mutado	100,0%	0,75
		No Mutado	73,6%	
	Colon distal	Mutado	100,0%	0,49
		No Mutado	60,4%	
	Recto	Mutado	100,0%	0,43
		No Mutado	72,3%	
Tipo histológico	Adenocarcinoma	Mutado	100,0%	0,29
		No Mutado	70,5%	
	Mucinoso	Mutado	--	--
		No Mutado	51,3%	
Grado de diferenciación	I	Mutado	100,0%	0,38
		No Mutado	70,6%	
	II	Mutado	--	--
		No Mutado	71,2%	
	III	Mutado	100,0%	0,46
		No Mutado	54,5%	
MSI	MSS	Mutado	100,0%	0,25
		No Mutado	66,6%	
	MSI-L	Mutado	--	--
		No Mutado	80,8%	
	MSI-H	Mutado	--	--
		No Mutado	83,7%	

SLE: supervivencia libre de enfermedad acumulada. HR: hazard ratio. IC95%: intervalo de confianza 95% Nivel de significación: $p \leq 0,05$. Tendencia: $p < 0,1$.

Tabla III.I. Análisis estratificado de la supervivencia libre de enfermedad en función de las mutaciones del codón 288 (exón 8) del gen *p53*. *Serie de pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos. (Marzo 1995-Abril 2003)*

Variable		Codón 288	SLE (86 meses)	p
Sexo	Hombre	Mutado	100,0%	0,54
		No Mutado	68,0%	
	Mujer	Mutado	100,0%	0,64
		No Mutado	70,4%	
Edad	> 71 años	Mutado	100,0%	0,42
		No Mutado	68,1%	
	< 71 años	Mutado	--	--
		No Mutado	70,4%	
Estadio Tumoral	A+B	Mutado	100,0%	0,71
		No Mutado	81,9%	
	C	Mutado	100,0%	0,44
		No Mutado	52,5%	
	D	Mutado	--	--
		No Mutado	17,8%	
Localización del Tumor	Colon proximal	Mutado	--	--
		No Mutado	73,7%	
	Colon distal	Mutado	--	--
		No Mutado	60,9%	
	Recto	Mutado	100,0%	0,45
		No Mutado	72,4%	
Tipo histológico	Adenocarcinoma	Mutado	100,0%	0,44
		No Mutado	70,7%	
	Mucinoso	Mutado	--	--
		No Mutado	51,3%	
Grado de diferenciación	I	Mutado	100,0%	0,56
		No Mutado	70,8%	
	II	Mutado	100,0%	0,60
		No Mutado	70,7%	
	III	Mutado	--	--
		No Mutado	58,3%	
MSI	MSS	Mutado	100,0%	0,40
		No Mutado	66,3%	
	MSI-L	Mutado	--	--
		No Mutado	80,8%	
	MSI-H	Mutado	--	--
		No Mutado	83,7%	

SLE: supervivencia libre de enfermedad acumulada. HR: hazard ratio. IC95%: intervalo de confianza 95% Nivel de significación: $p \leq 0,05$. Tendencia: $p < 0,1$.

Tabla III.J. Análisis estratificado de la supervivencia libre de enfermedad en función de las mutaciones del codón 289 (exón 8) del gen *p53*. *Serie de pacientes diagnosticados de carcinoma colorrectal. Hospital Clínico San Carlos. (Marzo 1995-Abril 2003)*

Variable		Codón 289	SLE (86 meses)	p
Sexo	Hombre	Mutado	--	--
		No Mutado	68,3%	
	Mujer	Mutado	50,0%	0,91
		No Mutado	70,8%	
Edad	> 71 años	Mutado	0,0%	0,92
		No Mutado	69,0%	
	< 71 años	Mutado	100,0%	0,56
		No Mutado	70,2%	
Estadio Tumoral	A+B	Mutado	100,0%	0,57
		No Mutado	81,8%	
	C	Mutado	0,0%	0,88
		No Mutado	54,0%	
	D	Mutado	--	--
		No Mutado	17,8%	
Localización del Tumor	Colon proximal	Mutado	100,0%	0,64
		No Mutado	73,4%	
	Colon distal	Mutado	0,0%	0,71
		No Mutado	61,9%	
	Recto	Mutado	100,0%	0,58
		No Mutado	72,6%	
Tipo histológico	Adenocarcinoma	Mutado	50,0%	0,87
		No Mutado	71,0%	
	Mucinoso	Mutado	--	--
		No Mutado	51,3%	
Grado de diferenciación	I	Mutado	50,0%	0,91
		No Mutado	71,1%	
	II	Mutado	--	--
		No Mutado	71,2%	
	III	Mutado	--	--
		No Mutado	58,3%	
MSI	MSS	Mutado	50,0%	1,00
		No Mutado	66,8%	
	MSI-L	Mutado	--	--
		No Mutado	80,8%	
	MSI-H	Mutado	100,0%	0,74
		No Mutado	83,2%	

SLE: supervivencia libre de enfermedad acumulada. HR: hazard ratio. IC95%: intervalo de confianza 95% Nivel de significación: $p \leq 0,05$. Tendencia: $p < 0,1$.

Anexo IV: Consentimiento Informado

Estudio de las Alteraciones genéticas en pacientes intervenidos por carcinoma colorrectal.

El cáncer es un proceso del cual se desconocen sus causas y en los últimos años se están estudiando, desde la Biología Molecular, las implicaciones que las alteraciones genéticas pueden tener en su desarrollo.

Usted ha sido intervenido quirúrgicamente de patología colorrectal en el Servicio de Cirugía del Hospital Clínico San Carlos de Madrid.

Desearíamos que usted participe voluntariamente en un estudio que, de una forma sencilla, analizará en una pequeña muestra de tejido de la obtenida en el acto quirúrgico, distintos parámetros genéticos. Estas determinaciones no supondrán ninguna molestia añadida, en suma, no comporta riesgo alguno para usted. El material genético obtenido de la muestra solo se empleará para esta investigación.

Su participación en este estudio es voluntaria. Los datos resultantes de los análisis se almacenarán en un archivo seguro. Los profesionales sanitarios del centro tendrán acceso a los datos que consten en su historia clínica cuando sea necesario. El personal que acceda a los datos clínicos y genéticos quedará sujeto a la Ley de regulación del tratamiento automatizado de datos de carácter personal y la legislación sanitaria aplicable (Ley Orgánica 5/1992 de 29 de Octubre)

Habiendo comprendido lo anteriormente expuesto, doy mi consentimiento para participar en el estudio anteriormente indicado, en el que entiendo que puedo retirar mi consentimiento en cualquier momento.

Madrid a _____ de _____ -- _____

.....
Firma del paciente o de la persona legalmente competente para dar la autorización.

.....
Firma y número de colegiado del médico.